

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Studium fluorescence u vybraných benzimidazolů

Study of fluorescence of selected benzimidazoles

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2009

Monika Richtrová

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a pramenů a v práci řádně citovány.

.....

Datum

.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za podnětné rady a připomínky, vstřícný přístup a konzultace, které mi poskytl při vypracování této diplomové práce.

Obsah

Souhrn	1
Abstract.....	2
1 Úvod.....	3
2 Teoretická část.....	5
2.1 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	6
2.2 Fotoluminiscenční analýza.....	9
2.3 Vliv rozpouštědla na fluorescenci.....	15
2.4 Farmaceutické využití benzimidazolů.....	16
2.5 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl): fluorescenční činidlo pro derivatizaci aminů a aminokyselin.....	19
2.6 Průběh derivatizační reakce	20
3 Praktická část.....	23
3.1 Chemikálie	24
3.1.1 Sledovaná léčiva.....	24
3.1.2 Derivatizační činidlo pro fluorimetrii	27
3.1.3 Další chemikálie.....	28
3.2 Použité přístroje	29
3.3 Použité roztoky	29
3.3.1 Příprava roztoků FLU, TBZ, ABZ, 2-AB, BEN, MBC, OXI v methanolu (resp. v acetonitrilu)	29
3.3.2 Příprava zásobního roztoku MBZ	29
3.3.3 Příprava fosfátového pufru.....	30
3.3.4 Příprava borátového pufru.....	30
3.3.5 Příprava roztoku derivatizačního činidla NBD-Cl	30
3.3.6 Reakční směs.....	30
3.4 Měření absorpčních spekter v UV-VIS oblasti a spekter fluorescenčních:.....	31
3.5 Studium derivatizační reakce MBZ:	32
3.5.1 Stanovení optimálního pH.....	32
3.5.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu.....	32
3.5.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na teplotě v reakční směsi	32

3.6	Stanovení stechiometrie derivatizační reakce:	33
3.6.1	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku MBZ při konstantní koncentraci činidla NBD-Cl	33
3.6.2	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci činidla NBD-Cl při konstantní koncentraci MBZ	33
3.7	Stanovení opakovatelnosti metody	34
4	Výsledky	35
4.1	Měření absorpčních spekter v UV-VIS oblasti a spekter fluorescenčních:	36
4.1.1	UV-VIS absorpční spektra benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu	36
4.1.2	Fluorescenční spektra benzimidazolů v roztocích v methanolu a acetonitrilu	43
4.1.3	UV-VIS absorpční spektra v roztocích s přidavkem fosfátového pufru	49
4.1.4	Fluorescenční spektra v roztocích s přidavkem fosfátového pufru	55
4.2	Studium derivatizační reakce MBZ:	61
4.2.1	Stanovení optimálního pH	61
4.2.2	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu	62
4.2.3	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na teplotě v reakční směsi	63
4.3	Stanovení stechiometrie derivatizační reakce:	64
4.3.1	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku MBZ při konstantní koncentraci činidla NBD-Cl	64
4.3.2	Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci činidla NBD-Cl při konstantní koncentraci MBZ	67
4.4	Stanovení opakovatelnosti metody	69
5	Diskuze	70
6	Závěr	75
	Použitá literatura a zdroje	77

Souhrn

V práci je studován vliv rozpouštědel na fluorescenci sedmi vybraných benzimidazolů (redukovaného flubendazolu, albendazolu, 2-aminobenzimidazolu, carbendazimu, benomylu, thiabendazolu a oxibendazolu). Bylo zjištěno, že rozpouštědla, která jsou užívána při kapalinové chromatografii jako mobilní fáze, ovlivňují fluorescenci jednotlivých benzimidazolů velmi různorodě. Tvar fluorescenčních spekter závisí velmi silně na struktuře daného benzimidazolu. Získané výsledky mohou sloužit jako východiska při vývoji chromatografických metod pro stanovení benzimidazolů s fluorescenční detekcí.

Ve druhé části práce byla studována derivatizace hydrolyzovaného mebendazolu pomocí činidla 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu, která by umožnila fluorescenční detekci této látky. Dosažené výsledky však nedávají takovému postupu příliš nadějí.

Abstract

The influence of used solvents on fluorescence of seven selected benzimidazoles (reduced flubendazole, albendazole, 2-aminobenzimidazole, carbendazim, benomyl, thiabendazole and oxibendazole) is studied in this thesis. It was found, that solvents, used in liquid chromatography as mobile phases, influence the fluorescence of individual benzimidazoles in a very diverse ways. The shape of the fluorescence spectra is very strongly dependent on the structure of a benzimidazole. The obtained results can serve as starting points during a development of chromatographic methods for a benzimidazoles determination with the fluorimetric detection.

In the other part of the thesis, a derivatization of hydrolyzed mebendazole with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole is studied as a way enabling a fluorescence detection of this substance. Unfortunately, the obtained results are not promising.

1 Úvod

Sloučeniny souhrnně označované jako benzimidazoly se významně uplatňují jako anthelmintika v humánní i veterinární medicíně nebo jako fungicidy při skladování a transportu zemědělských produktů, například obilí. S těmito aplikacemi benzimidazolů souvisí požadavek na jejich analytickou kontrolu. Vzhledem k tomu, že skupina látek, jejichž základem je benzimidazolová struktura, je poměrně početná, představuje analýza těchto látek velmi zajímavou a rozmanitou součást analytické chemie. Důležitou metodou analýzy benzimidazolů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Významnou součástí HPLC analýz je detekce separovaných analytů. Protože rezidua fungicidů nebo metabolity anthelmintik je třeba zjišťovat ve velmi nízkých koncentracích, jsou nároky na citlivost detekce vysoké. Mezi citlivé detekční principy patří fluorescence. Fluorescence benzimidazolů je velice zajímavým tématem, neboť některé benzimidazoly vykazují nativní fluorescenci, jiné nefluoreskují. Při tom poměrně malá změna v molekule může schopnost fluorescence razantně změnit.

Tato diplomová práce si kladla za cíl prozkoumat fluorescenční spektra sedmi vybraných benzimidazolů, zejména z pohledu vlivu rozpouštědla na intenzitu fluorescence a polohu emisních maxim. Výsledky těchto pozorování by měly sloužit právě při HPLC ke snadnější volbě organického modifikátoru mobilní fáze a ke snadnější optimalizaci podmínek detekce. Ve druhé části práce je studována derivatizační reakce mezi hydrolyzovaným mebendazolem a 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem za účelem zavedení fluoroforu do molekuly hydrolyzovaného mebendazolu, který je významným metabolitem anthelmintika flubendazolu.

2 Teoretická část

2.1 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Absorpční spektrální metody jsou založené na měření intenzity elektromagnetického záření po průchodu roztokem zkoumané látky, při kterém dochází k interakci záření a hmoty. Absorpční spektrofotometrie v UV- VIS oblasti je hojně využívanou metodou. K absorpci záření dochází při průchodu elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové (UV; 200- 400 nm) a viditelné (VIS; 400- 800 nm) kyvetou s měřeným roztokem. Kvantitativně se hodnotí poměr intenzity záření vystupujícího z měřeného vzorku a intenzity záření dopadajícího. Měřený roztok část záření pohltí a část odrazí, proto je počáteční intenzita záření o tyto podíly při výstupu zeslabena. Absorpcí záření se zvýší energie molekuly nebo atomu, čímž se dostávají ze svého základního stavu o nejmenší energii do stavu excitovaného o energii vyšší.¹⁾

Absorpce závisí na vlnové délce záření, na struktuře a koncentraci absorbující látky a na tloušťce měřené vrstvy. Při absorpčním měření se pro danou vlnovou délku porovnává intenzita záření prošlého měrnou kyvetou I s intenzitou záření prošlého srovnávací kyvetou I_0 .²⁾ Podíl těchto intenzit se nazývá transmittance neboli propustnost T . Nejdůležitější určenou veličinou je absorbance A , což je záporný logaritmus transmittance. Závislost absorbance na vlnové délce je plynulá křivka, nazývaná absorpční spektrum. Absorpční spektrum podává základní informace o měřené látce. Tvar absorpčního spektra je závislý na typu a počtu chromoforů v molekule, a je také ovlivněn použitým rozpouštědlem. Závislost absorbance na koncentraci měřené látky při definované vlnové délce udává kalibrační křivka.

Jednotlivé oblasti absorpce ve spektru se nazývají absorpční pásy.¹⁾ Jednotlivý pás ve spektru odpovídá příslušnému typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Excitaci nejvíce podléhají π - elektrony soustředěné mezi atomy vázanými násobnou vazbou. U excitovaného orbitalu je π - elektronová hustota největší v okolí atomů vytvářející násobnou vazbu. Čím větší počet dvojných vazeb vzájemně konjuguje, tím je menší energie potřebná k vyvolání přechodu na vyšší energetickou hladinu. Zmenšuje se rozdíl energie mezi posledním obsazeným orbitalem (HOMO) a nejnižším prázdným orbitalem (LUMO). Energie potřebná k excitaci elektronů klesá a k absorpci tedy dochází při vyšších vlnových délkách.

Vlnová délka se může posunout až do viditelné oblasti spektra. Pokud se absorpce posune do viditelné oblasti spektra, látka se jeví jako barevná.³⁾

Spektrofotometrie v UV- VIS oblasti se využívá pro důkazy látek a jejich případných nečistot (kvalitativní analýza), a ke stanovení jejich obsahu (kvantitativní analýza). Pro důkazy (identifikaci) látek se využívají především hodnoty poloh maxim a minim udané příslušnými vlnovými délkami, doplněné údajem specifické absorpce či poměru absorbancí. Při analýzách léčiv se hodnoty odečtené z UV spektra analyzovaného léčiva se musí shodovat s hodnotami uvedenými v příslušném lékopisném článku (uvedeny hodnoty spektra standardu). UV spektrum vzorku analyzovaného léčiva se proto musí proměřovat za stejných podmínek uvedených v lékopise pro UV spektrum standardu, jako je stejné rozpouštědlo, stejná koncentrace analyzované látky, stejná síla vrstvy. Obě látky jsou identické, pokud souhlasí počet a poloha absorpčních maxim standardu a analyzované látky. Stopy nečistot v analyzované látce mohou negativně ovlivnit absorpční spektrum.

Kvantitativní analýza je založena na Lambertově- Beerově zákonu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Kde je:

A	absorbance měřeného roztoku
ε	molární absorpční koeficient pro danou vlnovou délku [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
c	molární koncentrace absorbující látky [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
l	síla měřené vrstvy [cm]

Tento vztah platí, je-li přítomna jedna absorbující složka. Pokud je přítomno více složek, je výsledná absorbance dána součtem absorbancí jednotlivých složek. Lambertův- Beerův zákon lze použít pouze pro monochromatické světlo, které lze získat pomocí monochromátoru či speciálními filtry. Měří se při vlnové délce maxima absorpčního pásu, kdy je měření nejcitlivější a nejpresnější. Sloučeniny, které vlastní absorpci nevykazují, lze vhodnými derivatizačními činidly převést na sloučeniny, které absorbují.

Pro praktické účely při analýze léčiv se využívá pojmu specifická absorbance, která vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 1g/ 100ml měřenou v 1cm

vrstvě při určité vlnové délce. Hodnota specifické absorpance je uvedena u příslušného lékopisného článku. Výpočet obsahu léčiv v analyzovaných vzorcích se provádí z poměru absorbancí standardu a stanovovaného léčiva; podle vzorce odvozeného z Lambertova- Beerova zákona nebo pomocí metody kalibrační křivky pro analýzu série vzorků, která je obzvláště výhodná pro vymezení lineární závislosti absorpance na koncentraci stanovovaného léčiva. ⁴⁾

UV- VIS spektrofotometrie je jednoduchá, selektivní a citlivá metoda, proto je nejvíce používanou metodou kvantitativního i kvalitativního stanovení.

2.2 Fotoluminiscenční analýza

Luminiscenční analýza je založena na principu emise fotoluminiscenčního záření molekulami při návratu do nižšího energetického stavu po předchozí excitaci elektromagnetickým zářením (světlem). Fotoluminiscenci dělíme na fosforescenci a fluorescenci. V praxi je výrazně více využívána fluorescence.

Fotoluminiscenční analýza se řídí principy kvantové fyziky. Elektrony se mohou nacházet pouze v určitých energetických stavech. Základní stav (E_0) představuje nejnížší energetickou hladinu. Energeticky vyšší hladiny (E_1 , E_2 ...) se nazývají excitované stavy. Přejedhod elektronu mezi jednotlivými hladinami je spjat s přijmem nebo vyzářením energie a tato energie je dána Planckovým vztahem:

$$\Delta E = h \cdot \nu ,$$

v němž je

h Planckova konstanta- $6,625 \cdot 10^{-34}$ J·s

ν kmitočet vyzářeného nebo absorbovaného fotonu

Analyzovaná látka nejdříve absorbuje primární elektromagnetické záření a molekuly se tak dostanou do excitovaného stavu. Při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii uvolňují energii ve formě emise záření (sekundární záření).⁵⁾ Sekundární záření nazýváme luminiscencí, pokud vyzářený foton má vlnovou délku v oblasti ultrafialové nebo viditelné části spektra. Část nadbytečné energie se může vyzářit v podobě tepla. Emitované záření má energii menší nebo rovnou energii excitačního záření a tedy vlnovou délku větší nebo rovnou než má vlnová délka primárního záření. Toto pravidlo vyjadřuje Stokesův zákon ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). Látky přitom emitují světlo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny.⁶⁾

Fluorescenci definují spontánní energetické přechody z excitovaného elektronového stavu, při kterých dochází k emisi záření. Molekula se při fluorescenci nachází v singletových stavech (ať už základních, či excitovaných), ve kterých je podle Pauliho principu vylučnosti součet spinů elektronů nulový. Fluorescence je pozorovatelná jen v průběhu působení primárního záření na látku, poté velmi rychle zaniká. Doba dohasínání je obvykle v rozmezí 10^{-6} až 10^{-9} s. Oproti tomu při fosforescenci se uplatňuje metastabilní tripletová hladina při přechodu

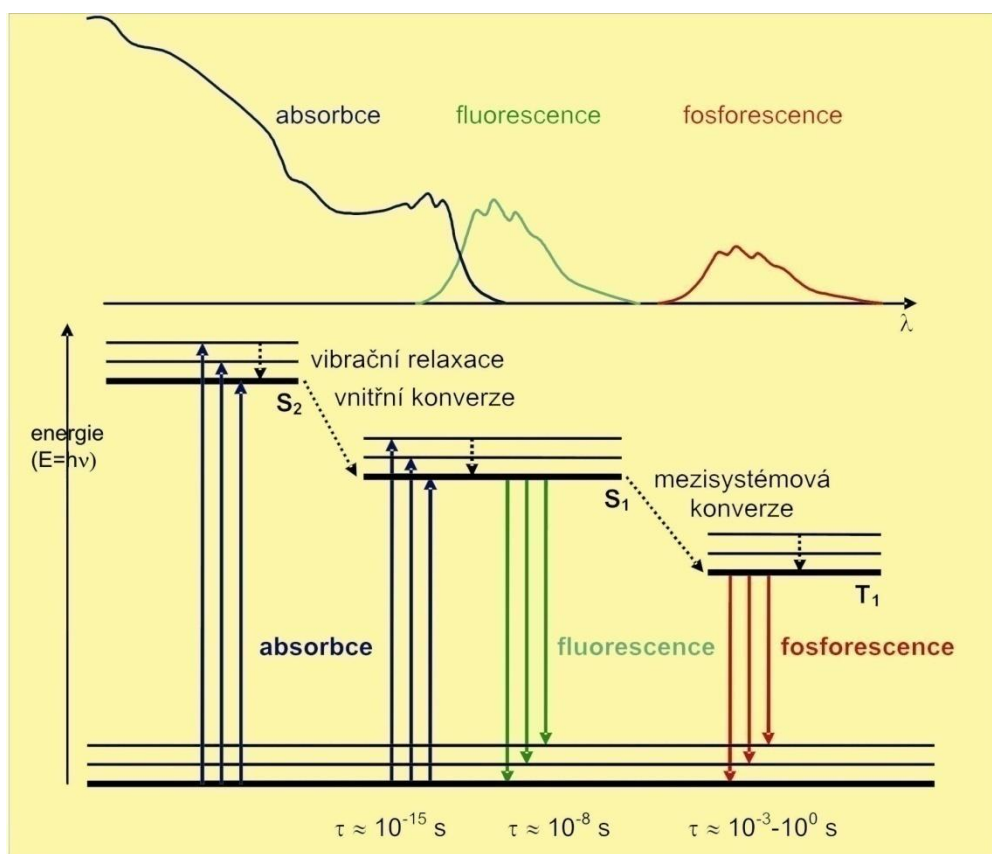
z excitovaného stavu. Tento děj je spojen se změnou spinu elektronu, což je z hlediska kvantové fyziky děj zakázaný a tedy málo pravděpodobný. Nejenom přechod do excitovaného stavu, ale i přechod z tripletového excitovaného stavu zpět do stavu základního (singletového) je spojen se změnou spinu, tudíž tento přechod vykazuje malou rychlost a vede k relativně dlouhé době života excitovaného tripletového stavu. Fosforescence má proto delší dobu dohasínání (10^{-3} až 10^{-2} s), záření je emitováno relativně dlouho i po ukončení primární excitace. Nelze ji však pozorovat v roztocích při pokojové teplotě. Molekula má totiž mnohem více času zbavit se přebytečné energie také nezářivým způsobem, především ve formě srážek s molekulami rozpouštědla. Proto se s fosforescencí setkáme spíše u pevných vzorků. Rozdílem mezi oběma typy luminiscence je tedy především čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před přechodem na nižší energetickou hladinu (doba dohasínání). Z pohledu fyzikálního se fluorescence a fosforescence liší multiplicitou stavu, z něhož dochází k vyzáření energie (singletový stav oproti tripletovému).

Z organických sloučenin silně fluoreskují především polyaromatické sloučeniny s volnými π -elektrony, cyklické a heterocyklické molekuly s konjugovaným systémem dvojných vazeb, tvořící izomerii nebo tautomerii, kondenzované heterocykly, a sloučeniny schopné tvořit ortochinoidní a parachinoidní cykly. Jedná se tedy o symetrické molekuly s rigidní strukturou, které mají absorbující části molekuly dostatečně chráněny a elektrony pevně vázány. Intenzivně fluoreskující sloučeniny se nazývají fluorofory nebo fluorescenční barviva.⁷⁾ Tyto sloučeniny jsou velice citlivé na změny pH, polarity, na přítomnost zhasedel fluorescence nebo oxidačních činidel. Charakteristické je teplotní zhasení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou.⁷⁾

Jednoduché znázornění vzniku fotoluminiscence po předchozím vystavení sloučeniny primárnímu záření ukazuje obr. 1, který zobrazuje zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter.⁷⁾ Analyzovaná látka nejprve absorbuje budící záření (modré šipky). Po absorpci světelného kvanta přecházejí elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1 , S_2 , ... a tripletních stavů T_1 , T_2 , ... Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď

zářivými přechody (luminiscence; zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; černé tečkované šipky). Doba trvání jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{-12} s. Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . Fosforescence je zářivý přechod z vyššího (T_1) do energeticky nižšího stavu o rozdílné multiplicitě (S_0).⁷⁾

Obrázek 1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonskiho diagramu)



Ze schématu je patrné také Kashovo pravidlo, které říká, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází nejprve k rychlé relaxaci vibrační energie a vnitřní

konverzi na rovnovážnou hladinu prvního excitovaného stavu S_1 , takže fluorescenční přechod nastává z této nejnižší vibrační hladiny. To vysvětluje, proč má emitované záření nižší energii než záření absorbované. Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv.⁷⁾

Stokesův posuv předepisuje pravidlo zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. Zmíněná symetrie platí pro velké množství organických molekul, a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou dány rozdílným geometrickým uspořádáním atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.⁷⁾

Fluorescenci charakterizují dvě spektra, dvě vlnové délky: emisní a excitační. Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce primárního záření s konstantní intenzitou. Emisní spektrum udává závislost intenzity fluorescence na vlnové délce sekundárního záření při konstantních podmínkách primárního záření.⁵⁾ Podle Vavilovova zákona nezávisí kvantové výtěžky a doba trvání excitovaného stavu molekul v roztoku na vlnové délce budícího záření. Tvar emisních spekter není z tohoto pohledu závislý na vlnové délce excitace.

Značný je vliv prostředí na absorpční a emisní spektra. Vlivem elektrostatických interakcí (dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól) v roztoku dochází mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Při měření fluorescence roztoku dochází ke změnám v optických spektrech (kvůli různé solvataci molekul), protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu různé dipólové momenty i polarizovatelnosti. Doba potřebná pro molekulární relaxaci je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. Část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem fluoroforu, proto je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu. K emisi dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace.⁷⁾

Pro určování koncentrace látek (kvantitativní analýza) u zředěných roztoků se vychází ze vztahu mezi koncentrací a intenzitou fluorescence. Tato hodnota závisí na

intenzitě absorbovaného záření a na kvantovém výtěžku fluorescence. Koncentrace analyzované fluoreskující látky se stanoví metodou kalibrační křivky. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci látky vyplývá z úpravy Lambertova- Beerova zákona:

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c,$$

kde je:

I_f	intenzita fluorescence
K	konstanta pro daný systém a zařízení
I_0	intenzita absorpčního záření
ε	molární absorpční koeficient
l	tloušťka vrstvy (délka kyvety)
c	molární koncentrace vzorku

Kvantový výtěžek fluorescence (poměr počtu světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu) se pohybuje mezi hodnotami 0 a 1, přičemž 0 odpovídá látce, která absorbuje světlo, ale nefluoreskuje. Kvantový výtěžek nemůže být větší než 1, pokud je dodržen Stokesův zákon. Fluorescence látek s minimálním kvantovým výtěžkem je moderními přístroji dobře detekovatelná. Ovšem již existuje řada vhodných metod, jak derivatizovat látky, které nefluoreskují, na deriváty fluoreskující. Problémem může být zhášení fluorescence nebo fotovybělování (photobleaching). Zhášení snižuje kvantový výtěžek fluorescence. Nastává při srážce excitovaného fluoroforu s molekulou zhášedla (kyslík, jód, brom) nebo při zhášení fluoroforu jím samotným při jeho vysokých koncentracích. Odlišným jevem je fotovybělování, kdy dochází k nevratné destrukci excitovaného fluoroforu. Ten již nemůže být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření (fluorescence je proces cyklický).

Při měření fluorescence je excitační foton poskytován excitační částí spektrofluorimetru, tedy zdrojem světla (polychromatické světlo halogenové žárovky nebo xenonové výbojky) a excitačním monochromátorem (úprava na monochromatické záření). Monochromatické záření prochází přes kyvetu se vzorkem. Emitované záření se měří pod úhlem 90°, a je zpracováno emisním

monochromátorem tak, aby pomocí detekčního zařízení (fotonásobiče) mohlo být zjištěno, jaká je intenzita světla emitovaného při různých vlnových délkách.^{8), 6)} Pro měření excitačního spektra se emisní monochromátor obvykle nastaví na vlnovou délku emisního maxima, a excitační monochromátor projede zvolenou oblast vlnových délek. Při měření emisního spektra je excitační monochromátor nastaven na konstantní vlnovou délku, obvykle odpovídající maximu excitačního (nebo absorpčního) spektra.⁸⁾

Fluorimetrie jako analytická metoda je ve srovnání s absorpční spektrofotometrií mnohem selektivnější. Metoda je také vysoce citlivá. Lze měřit již minimální koncentrace látek. Zatímco při spektrofotometrickém měření absorbance je měřenou veličinou pokles intenzity paprsku procházejícího vzorkem, ve fluorimetru měříme intenzitu excitačního záření, přičemž intenzita emitovaného záření je úměrná intenzitě excitačního záření, kterou můžeme regulovat prostřednictvím šířky štěrbiny excitačního monochromátoru.⁸⁾ Osvědčuje se v biofyzikálním, biochemickém, lékařském výzkumu, v klinické chemii a dalších oborech při určování nízké koncentrace fluoreskující látky ve směsi v roztocích, při měření aktivity enzymů, při sledování vazby některých ligandů na biopolymery (fluorescenční sondy), bioanalytické techniky využívající mikrotitrační destičky (ELISA test). Fluorescenční průtokové detektory jsou dnes již standardní výbavou kapalinových chromatografů. Fluorescenční metody jsou proto velice rozšířené a používané.

2.3 Vliv rozpouštědla na fluorescenci

Benzimidazoly patří mezi azareny, heterocyklické sloučeniny, které mají vázaný dusík v aromatickém kruhu. Fluorescence azarenů je velmi silně závislá na rozpouštědle, v němž jsou jejich molekuly rozpuštěny ¹⁷⁾.

Vliv rozpouštědla na fluorescenci je u těchto látek odlišný od vlivu rozpouštědla na fluorescenci aromatických uhlovodíků. Zjednodušeně lze říci, že v případě aromatických uhlovodíků je kvantový výtěžek fluorescence tím vyšší, čím je nižší polarita použitého rozpouštědla, daná příslušnou dielektrickou konstantou. U azarenů se naopak nacházejí překvapivě vysoké kvantové výtěžky fluorescence při použití protických rozpouštědel (například alkoholů) v porovnání s kvantovými výtěžky fluorescence roztoků azarenů v rozpouštědlech aprotických (například uhlovodících). Toto pravidlo však platí striktně pouze u azarenů, v nichž je heterocyklický dusík vázán k sousednímu atomu uhlíku dvojnou vazbou. Obsahuje-li azaren heterocyklický dusík vázaný k sousedním uhlíkům pouze jednoduchou vazbou, bývá situace složitější a vliv rozpouštědla na fluorescenci je třeba vyzkoušet experimentálně.

2.4 Farmaceutické využití benzimidazolů

Skupina léčiv odvozená od chemické struktury benzimidazolů je hojně využívaná ve veterinárním lékařství při terapii endoparazitóz. Benzimidazoly se řadí do skupiny anthelmintik se širokým spektrem účinku. Jako léčiva mají účinky především antinematodní, ve větších dávkách pak účinky anticestodní, částečně také účinky antitrepatodní a mohou vykazovat též antimykotickou aktivitu.

Mechanismus účinku těchto látek je založen na biochemických pochodech a rozvratu energetického metabolismu parazita. Inhibují syntézu β -tubulinových subjednotek mikrotubulů, narušují tak transport a utilizaci glukózy. Důsledkem je energetické vyčerpání, ztráta pohyblivosti střevních parazitů, jejich pozvolné odumření a odstranění z gastrointestinálního traktu.⁹⁾ Inhibicí syntézy mikrotubulů se benzimidazoly velmi podobají látkám s antimitotickou aktivitou. Důležité však je, že benzimidazoly mají mnohonásobně větší afinitu k parazitárním mikrotubulům než k lidským (resp. živočišným). Proto jsou tato léčiva bezpečná, a to i po mírném překročení terapeutické dávky. Ukázalo se, že benzimidazoly také inhibují cyklus dikarboxylových kyselin, který probíhá u anaerobních parazitů a to v opačném směru než Krebsův cyklus u aerobních organismů. Konkrétně inhibují fumarát reduktázu, tedy ve fázi přeměny fumarátu na koncový sukcínát. Tato enzymová blokáda způsobí parazitům energetický kolaps a vede k jejich odumírání.¹⁰⁾ Léčiva působí převážně na dospělá stádia nematod a giardií, většina benzimidazolů je účinná i na vývojová stádia, některé působí i ovocidně.

Účinnost benzimidazolů kolísá v závislosti na průchodu gastrointestinálním traktem, na jejich absorpci a přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách, na intenzitě infekce, ale také na lékové formě. Léčiva je třeba podávat opakovaně (zvířata s jednodukovým žaludkem), nebo jednorázově (zvířata s víceukovým žaludkem). Využívají se jak vlastní benzimidazolová léčiva, tak i jejich proléčiva. Následkem příjmu nízkých dávek, zvýšeného efluxu léčiva parazitem, či nižší vazby na cílové receptory se snižuje kumulace léčiva v buňkách parazita a vyvíjí se rezistence. Jsou proto vhodné kombinace těchto léčiv s ostatními anthelmintiky.

Jednotlivé benzimidazoly se od sebe liší především farmakokinetikou. Mají systémový účinek, musejí se tudíž nejdříve rozpustit ve střevních tekutinách a poté

vstřebat sliznicí gastrointestinálního traktu. Záleží proto na rozpustnosti jednotlivých látek ve vodě. Maximálních plazmatických koncentrací dosahují jednotlivé benzimidazoly v závislosti na rychlosti své absorpce. Čím rychleji látky dosáhnou maximálních plazmatických koncentrací, tím rychleji se budou metabolizovat a následně vylučovat z těla. Látky s delší biologickou aktivitou vykazují tedy větší anthelmintický potenciál. Důležitou roli při absorpci látek z gastrointestinálního traktu hraje také přítomnost bakteriální střevní mikroflóry a změny pH při různých modifikacích stravy. Distribuce látek závisí na velikosti molekuly, lipofilitě a na vazbě na plazmatické bílkoviny. Většina používaných benzimidazolů vykazuje vazbu na plazmatické bílkoviny menší než 50%, relativně vysokou schopnost distribuce a rychlou eliminaci. Farmakokinetika látek je závislá také na druhu zvířete. Menší odlišnosti, především v rychlosti farmakokinetických procesů látek obsahujících v molekule sulfid, mohou být např. u skotu ve srovnání s ovci.¹⁰⁾ Biotransformace benzimidazolů je značná. Potvrzen je jeden i více hlavních metabolitů ze zvířecích tkání či z mléka a z vajec. Je proto nutné dbát na dodržení ochranné lhůty u chovných zvířat léčených těmito látkami.

Monitorování metabolitů benzimidazolů v potravinách, tkáních a tělních tekutinách je složité především v existenci značného množství těchto reziduí, jejichž sledování nelze pokrýt jen jednou analytickou metodou. Alternativou je proto výběr metabolitu, který má ve tkáních a potravinách hlavní zastoupení, následuje optimální způsob extrakce metabolitu z tkáně či tělní tekutiny, a poté vyvinutí analytické metody na jeho stanovení. Vhodnou metodou na stanovení benzimidazolů i jejich metabolitů jsou chromatografické metody. Jedná se o metody separační s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení jednotlivých složek analyzované směsi. V posledních letech se farmakokinetika reziduí benzimidazolů zkoumá metodou LC-MS/MS¹⁰⁾. Tato metoda spojuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s analýzou hmotnostní spektrometrie, splňuje požadavky rychlé a citlivé detekce metabolitů benzimidazolů v tkáních a živočišných produktech chovných zvířat. Vhodnou alternativní metodikou je HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí¹⁰⁾. Jde především o vysoce selektivní a citlivou metodu s kvantitativním hodnocením metabolitů benzimidazolů již v minimálním množství v potravinách a tkáních, oproti absorpčním spektrálním metodám s požadavkem vyšší koncentrace látek.

HPLC s UV detekcí je univerzální metodou, zatímco fluorescenční detektor je mnohem selektivnější a citlivější s výhodou použitelný v případech, kdy analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Právě vzhledem k dostatečné citlivosti je fluorescenční detekce možnou alternativou k MS detekci při HPLC benzimidazolů ¹¹⁾.

Chromatografické metody jsou v současné době upřednostňované pro svou automatizaci a vysokou přesnost detekce benzimidazolů a jejich reziduí v analyzované směsi.

2.5 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl): fluorescenční činidlo pro derivatizaci aminů a aminokyselin

V průběhu zkoumání derivátů 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu pro potenciální antileukemickou aktivitu a schopnost inhibovat thiolové skupiny zjistili Gosh a Whitehouse ¹²⁾, že několik 7-amino derivátů této sloučeniny vykazovalo fluorescenční aktivitu, pokud amino skupina byla odvozena od alifatických aminů. Tato skutečnost zajistila identifikaci aminokyselin a peptidů podmíněnou reakcí s tímto fluorescenčním činidlem. Při mnohých experimentech bylo zjištěno, že silná fluorescence aminokyselin a peptidů vychází právě z vazby aminoskupiny na molekulu NBD-Cl. Silná fluorescence 7-aminoNBD se projevila zejména ve slabě polárních rozpouštědlech po excitaci viditelným světlem ($\lambda = 464$ nm).

Sloučenina NBD-Cl, známá také pod názvem 7-chloro-4-nitrobenzofurazan, je nefluoreskující světle žlutá pevná látka. Její předností je vysoká stabilita (např. vůči vlhkosti), a rozpustnost ve vodných roztocích, což umožňuje určovat již velice malé koncentrace primárních a sekundárních aminů a aminokyselin jako fluoreskujících NBD derivátů. Substituenty aminoskupiny omezují konjugaci s NBD-Cl a způsobí tak drastickou ztrátu fluorescence. Naproti tomu jiné sloučeniny než amino deriváty, obsahující v poloze 7 jinou elektrodonorovou skupinu (-OR, -SR) fluorescence vykazují, ale podstatně slabší než 7-amino deriváty. Dále se ukázalo, že 4-aminobenzofurazan vykazuje podstatně menší fluorescence než odpovídající 7-nitro deriváty. Nitro skupina evidentně intenzifikuje fluorescence, a také posunuje absorpční a emisní frekvence (vlnové délky), což je u této skupiny nezvyklé.

Příkladem využití popsaného postupu je kvantitativní stanovení lisinoprilu v lékových formách a v lidské plazmě pomocí derivatizace se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem, které provedli El-Emam, Hansen, Moustafa, El-Ashry, El-Sherbiny metodami absorpční spektrofotometrie a HPLC s fluorescenční detekcí. ¹³⁾

2.6 Průběh derivatizační reakce

Reakční mechanismus řadí derivatizaci NBD-Cl mezi aromatické nukleofilní substituce, při nichž substituent vázaný na aromatickém jádře je nahrazen i se svým vazebným elektronovým párem nukleofilní částicí. Vzhledem k povaze aromatických systémů, které se vyznačují značnou stabilitou, probíhají tyto reakce zpravidla obtížněji, za drsnějších podmínek.¹⁴⁾ Činidlem v nukleofilní substituci se rozumí malá molekula s volným elektronovým párem. Má proto schopnost interagovat s molekulou, která má v některé své části nedostatek elektronů. V reakci se uplatňuje také substrát, což je obvykle molekula větší než činidlo. Obsahuje skupiny s možností polarizace vazby, a tím i tvorby vhodných podmínek pro nukleofilní atak. Odstupující skupina je charakterizována vždy menší bazicitou, tudíž menší nukleofilitou než činidlo. Nemůže jí proto být silná báze (hydroxyl apod.). Stabilita aromatických systémů se oslabí, a tudíž se zlepší podmínky pro reakci, pokud je nahrazovaná skupina aktivována substituentem s I- a M- efekty. Samozřejmě záleží na povaze nahrazované skupiny. Nahrazovaným substituentem u NBD-Cl je halogen- chlór, který lze nahradit snadno, jelikož je navíc aktivován přítomnou nitroskupinou žádoucími zápornými efekty.¹⁶⁾

Podle počtu molekul účastnících se přechodového (tranzitního) stavu, se nukleofilní substituce rozděluje na monomolekulární a bimolekulární. O reakcích monomolekulárních hovoříme, vzniká-li reaktivní meziprodukt z jediné molekuly (vzniká karbokation). O reakce bimolekulární se jedná, účastní-li se tranzitního stavu obě reagující molekuly (nevzniká karbokation). K reakci může dojít i v rámci jediné molekuly, jedná se pak o substituci nukleofilní intramolekulární. Nukleofilní aromatická substituce může probíhat třemi mechanismy. Mechanismem monomolekulárním, a dále bimolekulárním adičně- eliminačním mechanismem, a bimolekulárním eliminačně- adičním mechanismem.¹⁴⁾

V případě derivatizace vhodných benzimidazolů pomocí NBD-Cl jde o reakční mechanismus nukleofilní aromatické substituce bimolekulární, probíhající mechanismem adičně- eliminačním. Substrátem je NBD-Cl, nukleofilním činidlem je příslušný amin a odstupující skupinou Cl⁻. Působením nukleofilního ataku přechází uhlík nesoucí atom chlóru z planární hybridizace sp² na tetraedrickou hybridizaci sp³, čímž se dočasně poruší konjugace aromatického jádra a elektrony se koncentrují

přednostně do poloh ortho a para. V molekule NBD-Cl je v poloze para přítomna nitroskupina, přebytek elektronů je tedy odváděn a atak nukleofilního činidla se usnadní a urychlí. Klesá totiž energetická náročnost reakce, neboť je přítomna právě deaktivující nitroskupina. Reakce je dvoustupňová. Na rychlosti reakce prvního stupně se významně podílí především odstupující skupina, v závislosti na tom, jak svým polárním efektem sníží elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, na který se váže. Čím více sníží tuto elektronovou hustotu, tím snazší a rychlejší bude reakce, neboť bude uhlík ochotněji podléhat nukleofilnímu činidlu. Pro rychlost druhého stupně, tj. rozpadu intermediátu, bude rozhodující množství energie potřebné k polárnímu štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou.¹⁵⁾ Ze všech poznatků tedy vyplývá, že čím více se sníží elektronová hustota na aromatickém uhlíku odstupující skupinou, tím lépe a rychleji bude přistupovat nukleofil na jádro v prvním stupni, ovšem tím obtížněji se bude štěpit vazba mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou v druhém stupni.

Předpokládané schéma reakce MBZ s derivatizačním činidlem NBD-Cl uvádí obrázek 2.

Obrázek 2: Předpokládané schéma reakce MBZ s NBD-Cl

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

3.1.1 *Sledovaná léčiva*

Hydrolyzovaný mebendazol (MBZ) – Jansen Pharmaceutica

Redukovaný flubendazol (FLU) – Jansen Pharmaceutica

Thiabendazol (TBZ) – Riedel- de Haën

Albendazol (ABZ) – Jansen Pharmaceutica

2-amino-benzimidazol (2-AB) – Riedel- de Haën

Benomyl (BEN) – Aldrich

Carbendazim (MBC) – Riedel- de Haën

Oxibendazol (OXI) – Sigma

3.1.2 Derivatizační činidlo pro fluorimetrii

7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) – Fluka

3.1.3 Další chemikálie

Kyselina boritá (H_3BO_3 krystalická)-Lachema n.p. Brno

Kyselina fosforečná (H_3PO_4)- Lachema n.p. Brno

Chlorid draselný (KCl)-Lachema n.p. Brno, o.z.Neratovice

Hydroxid sodný (NaOH)-Lachema n.p. Brno, o.z.Neratovice

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)- Lachema n.p. Brno, o.z.Neratovice

Methanol (CH_3OH)-Lach-Ner. s.r.o., Neratovice

Dimethylsulfoxid (DMSO)-Fluka

Kyselina chlorovodíková (HCl)-Lachema

Deionizovaná voda připravená reverzní osmózou

3.2 Použité přístroje

Spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard)

Spektrofluorimetr Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Electron Corporation)

pHmetr inoLab 720 (WTW) s kombinovanou pH elektrodou Theta typ 103

Ultratermostat U15 (Prüfgeräte-Werk Medingen)

Digitální analytické váhy (Satorius)

3.3 Použité roztoky

Methanolické a acetonitrilové roztoky FLU, TBZ, ABZ, 2-AB, BEN, MBC, OXI pro absorpční spektrofotometrii a fluorimetrii

Fosfátový pufr o příslušném pH

Zásobní a zředěné methanolické roztoky MBZ pro fluorimetrii

Borátový pufr příslušných hodnot pH

Methanolické roztoky NBD-Cl různých koncentrací

3.3.1 Příprava roztoků FLU, TBZ, ABZ, 2-AB, BEN, MBC, OXI v methanolu (resp. v acetonitrilu)

Navážky jednotlivých benzimidazolů jsem rozpustila v takovém množství DMSO, aby se benzimidazol právě rozpustil. Roztok jsem poté kvantitativně převedla do 25 ml odměrné baňky (v případě MBC do 50 ml odměrné baňky) a doplnila methanolem (resp. acetonitrilem).

3.3.2 Příprava zásobního roztoku MBZ

Základní roztok MBZ jsem si připravila rozpuštěním 4,4 mg MBZ ($M_r = 297$) v minimálním množství DMSO, aby se MBZ úplně rozpustil. Poté jsem roztok kvantitativně převedla do 25 ml odměrné baňky a doplnila methanolem. Připravený zásobní roztok měl koncentraci 0,5926 mmol/l. Ostatní roztoky jsem připravila ředěním zásobního roztoku.

3.3.3 Příprava fosfátového pufru

Navážila jsem si 1,7 g dihydrogenfosforečnanu draselného a látku rozpustila v 500 ml deionizované vody. Poté jsem roztok upravila koncentrovanou kyselinou fosforečnou na pH 3,0.

3.3.4 Příprava borátového pufru

Navážila jsem si 0,620 g kyseliny borité a 0,75 g chloridu draselného a obě látky jsem rozpustila ve 100 ml deionizované vody. Vzniklý roztok jsem upravila roztokem NaOH ($c = 0,2 \text{ mol/l}$) na požadované pH.

3.3.5 Příprava roztoku derivatizačního činidla NBD-Cl

Roztok činidla (0,3%) jsem si připravila vždy včas potřeby navážením 0,03 g činidla ($M_r = 200$) a doplnila jsem methanolem do celkového objemu 10 ml. Vzniklý roztok měl koncentraci 0,015 mol/l. Roztoky jiných koncentrací jsem si připravila příslušným ředěním.

3.3.6 Reakční směs

Reakční směs vznikla pipetováním vždy 1 ml roztoku MBZ v dané koncentraci, 4 ml borátového pufru o určitém pH, a 2 ml roztoku derivatizačního činidla NBD-Cl v dané koncentraci, většinou do 10 ml odměrné baňky.

3.4 Měření absorpčních spekter v UV-VIS oblasti a spekter fluorescenčních:

V šesti 25 ml odměrných baňkách jsem měla připravené roztoky FLU, TBZ, ABZ v methanolu, resp. v acetonitrilu. Roztok FLU jsem zředila 20x, roztoky TBZ a ABZ jsem ředila 40x. V dalších osmi odměrných baňkách jsem měla připravené roztoky 2 -AB, BEN, MBC, OXI v methanolu, resp. acetonitrilu, které jsem poté ředila na různé koncentrace. Změřila jsem absorpční spektra takto připravených roztoků benzimidazolů proti methanolu, resp. acetonitrilu.

Následně jsem si připravila směs 1,5 ml příslušného zředěného roztoku benzimidazolu a 3,5 ml fosfátového pufru o pH 3,0. Ve slepých vzorcích byl 1,5 ml benzimidazolu nahrazen methanolem nebo acetonitrilem. Změřila jsem absorpční spektra takto připravených roztoků benzimidazolů proti příslušným slepým vzorkům.

U všech roztoků benzimidazolů byla změřena fluorescenční spektra. Jako excitační vlnové délky byly použity vlnové délky příslušných absorpčních maxim.

3.5 Studium derivatizační reakce MBZ:

3.5.1 Stanovení optimálního pH

Připravila jsem si do kádinek borátový pufr a každý upravila na jiné pH. Do 10 ml odměrných baněk jsem pipetovala vždy 1 ml zásobního roztoku MBZ ($c = 0,5926 \text{ mmol/l}$), ve slepých vzorcích byl roztok MBZ nahrazen 1 ml methanolu. Přidala jsem 4 ml borátového pufru o pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0 a pH 11,0. Nakonec jsem přidala 2 ml 0,3% roztoku derivatizačního činidla NBD-Cl. Pečlivě uzavřené baňky jsem za stálého třepání po dobu 30 minut zahřívala v termostatické lázni při 60 °C. Poté jsem jednotlivé vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a methanolem doplnila do příslušného objemu 10 ml. Měřila jsem intenzitu fluorescence při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

3.5.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Složení reakční směsi i postup experimentu byl stejný jako v předchozím odstavci (3.5.1). pH borátového pufru bylo 9,0. Testovala jsem 10, 20 a 30 minut třepání v termostatické lázni při 60 °C.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

3.5.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na teplotě v reakční směsi

Složení reakční směsi i postup experimentu byl stejný jako v předchozím odstavci (3.5.1). Dobu třepání jsem zachovala 30 minut, pH borátového pufru bylo 9,0.

Zkoušela jsem teplotu lázně při třepání 50 °C, 60 °C a 70 °C.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

3.6 Stanovení stechiometrie derivatizační reakce:

3.6.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku MBZ při konstantní koncentraci činidla NBD-Cl

Při prvním experimentu jsem do čtyř 10 ml odměrných baněk pipetovala 1 ml roztoku MBZ v rozmezí koncentrací 0,1447 – 0,5791 mmol/ l. Přidala jsem 4 ml borátového pufru o pH 9,0 a 2 ml roztoku činidla NBD-Cl o koncentraci 3 g/ l. Teplota termostatické lázně byla 60 °C a doba třepání vzorků v lázni byla 30 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem do objemu 10 ml.

Při dalším experimentu byl roztok MBZ zředěn 10x, do reakční směsi jsem pipetovala 1 ml roztoku MBZ v rozmezí koncentrací 0,01438 – 0,05753 mmol/ l. Přidala jsem 4 ml borátového pufru o pH 9,0 a 2 ml roztoku činidla NBD-Cl o koncentraci 0,1 g/ l (30x zředěn). Teplota termostatické lázně byla 60 °C a doba třepání vzorků v lázni byla snížena na 10 minut. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem. Intenzitu fluorescence jsem měřila při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

3.6.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci činidla NBD-Cl při konstantní koncentraci MBZ

Do čtyř 10 ml odměrných baněk jsem pipetovala 1 ml zředěného zásobního roztoku MBZ o koncentraci 0,06329 mmol/ l, 4 ml pufru pH 9,0 a 2 ml činidla NBD-Cl v rozmezí koncentrací 25-200 mg/ l.

Náležitě uzavřené baňky jsem po dobu 10 minut třepala v termostatické lázni o teplotě 60 °C. Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem do objemu 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

3.7 Stanovení opakovatelnosti metody

Provedla jsem osm paralelních měření. Do osmi 10 ml odměrných baněk jsem pipetovala vždy 1 ml MBZ ($c = 0,014815 \text{ mmol/l}$), 4 ml borátového pufru o pH 9,0 a 2 ml činidla NBD-Cl ($c = 0,1 \text{ g/l}$).

Pečlivě zakryté zkumavky jsem za stálého třepání po dobu 10 minut zahřívala v termostatické lázni o teplotě 60°C . Poté jsem vzorky ochladila pod tekoucí vodou, přidala 0,2 ml koncentrované HCl a doplnila methanolem do objemu 10 ml.

Intenzitu fluorescence jsem měřila při excitační vlnové délce 470 nm a emisní vlnové délce 547 nm.

4 Výsledky

4.1 Měření absorpčních spekter v UV-VIS oblasti a spekter fluorescenčních:

4.1.1 UV-VIS absorpční spektra benzimidazolů v methanolu a acetonitrilu

Měřila jsem čtrnáct vzorků vybraných benzimidazolů za použití rozpouštědla acetonitrilu a methanolu. Podmínky byly následující:

- FLU ($M_r = 315,3$) - $m = 0,0233$ g ($c = 29,5 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 20x
- $m = 0,0186$ g ($c = 23,6 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 20x
- TBZ ($M_r = 201,25$) - $m = 0,0057$ g ($c = 11,3 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 40x
- $m = 0,0056$ g ($c = 11,1 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 40x
- ABZ ($M_r = 265,34$) - $m = 0,0066$ g ($c = 9,9 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 40x
- $m = 0,0066$ g ($c = 9,9 \cdot 10^{-4}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 40x
- 2-AB ($M_r = 133,15$) - $m = 0,0071$ g ($c = 2,13 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 20x
- $m = 0,0072$ g ($c = 2,163 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 80x
- BEN ($M_r = 290,32$) - $m = 0,0092$ g ($c = 1,267 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 10x
- $m = 0,009$ g ($c = 1,240 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 20x
- MBC ($M_r = 191,19$) - $m = 0,0071$ g ($c = 0,7427 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 20x
- $m = 0,0068$ g ($c = 0,7113 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 40x
- OXI ($M_r = 249,3$) - $m = 0,0039$ g ($c = 0,6257 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v methanolu; roztok zředěn 20x
- $m = 0,0039$ g ($c = 0,6257 \cdot 10^{-3}$ mol/ l) v acetonitrilu; roztok zředěn 20x

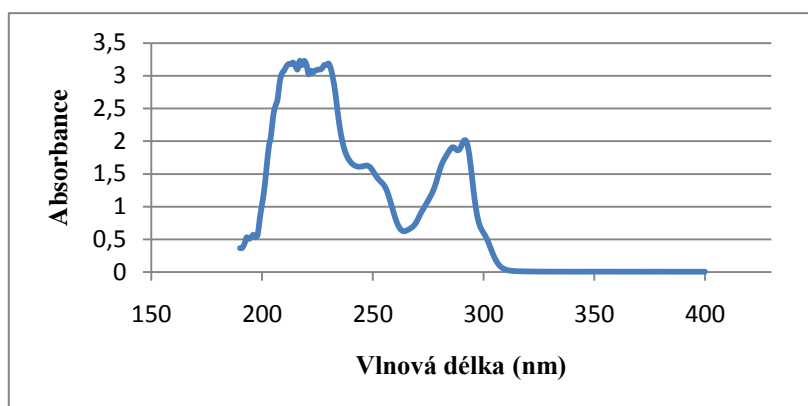
Hodnoty absorpčních maxim uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Absorpční maxima zjištěná u jednotlivých roztoků

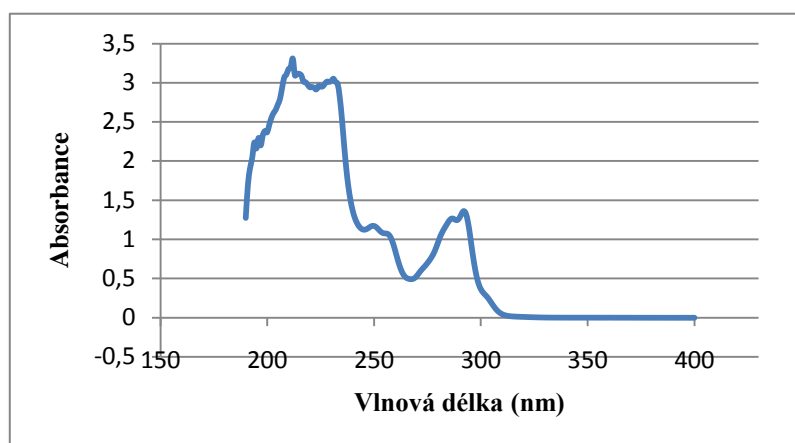
Methanolicke roztoky	c [mmol/l]	Maximální vlnové délky λ_{max} [nm]	Acetonitrilové roztoky	c [mmol/l]	Maximální vlnové délky λ_{max} [nm]
FLU	0,1475	292, 286, 247	FLU	0,118	212, 292, 287
TBZ	0,02825	209, 299, 243	TBZ	0,02775	209, 299, 311
ABZ	0,02475	211, 295	ABZ	0,02475	210, 296
2-AB	0,106	211, 243, 283	2-AB	0,027	200, 247, 284
BEN	0,1267	210, 244, 281, 287	BEN	0,062	207, 253, 287, 294
MBC	0,0371	207, 244, 281, 287	MBC	0,01778	202, 245, 281, 287
OXI	0,03128	207, 247, 296, 311	OXI	0,03128	209, 249, 296

Naměřená absorpční spektra uvádějí obrázky 3-16:

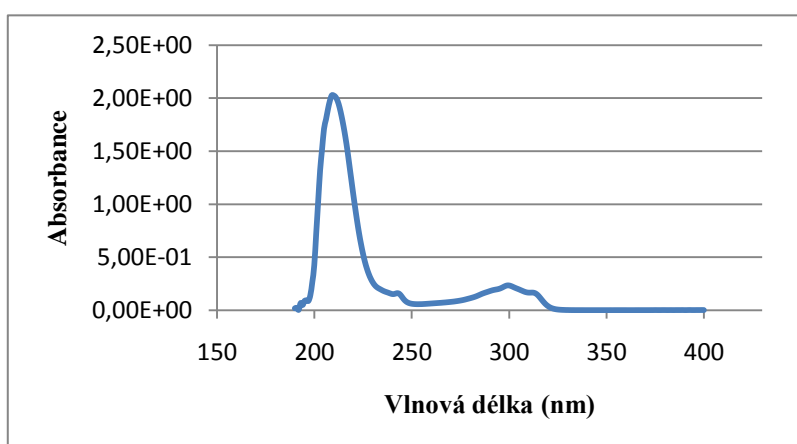
Obrázek 3: Absorpční spektrum FLU v methanolu



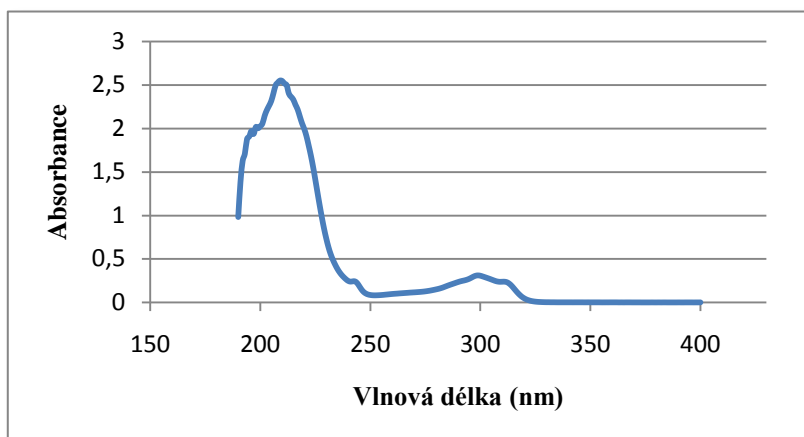
Obrázek 4: Absorpční spektrum FLU v acetonitrilu



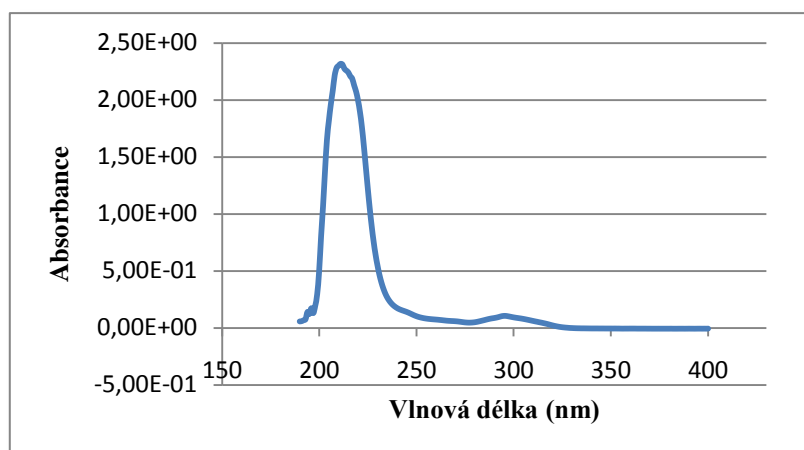
Obrázek 5: Absorpční spektrum TBZ v methanolu



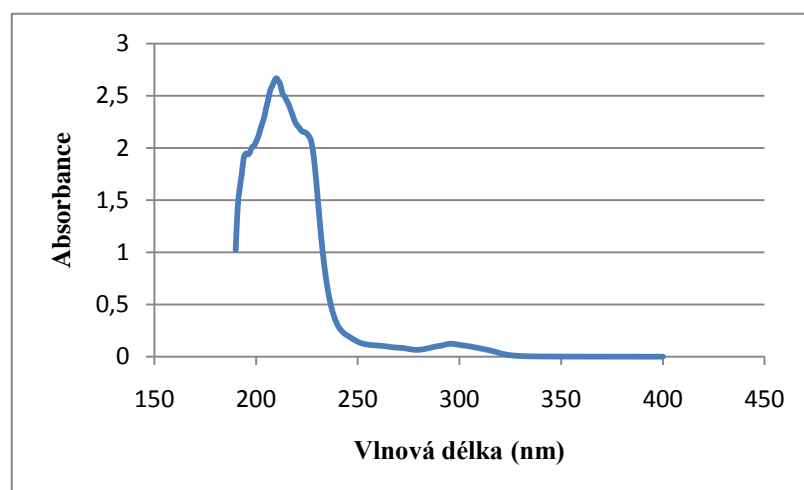
Obrázek 6: Absorpční spektrum TBZ v acetonitrilu



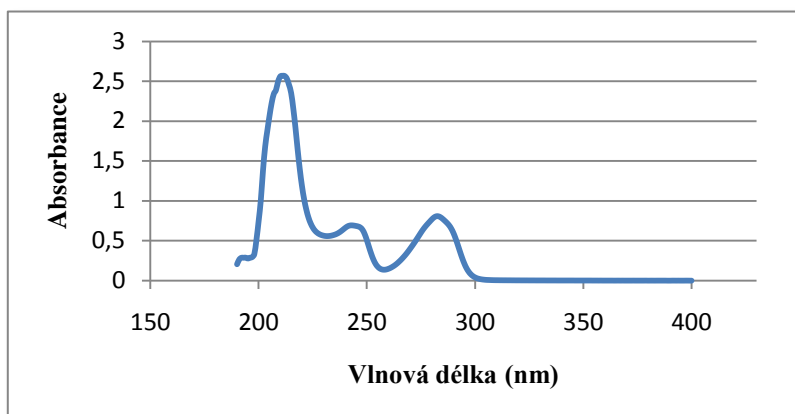
Obrázek 7: Absorpční spektrum ABZ v methanolu



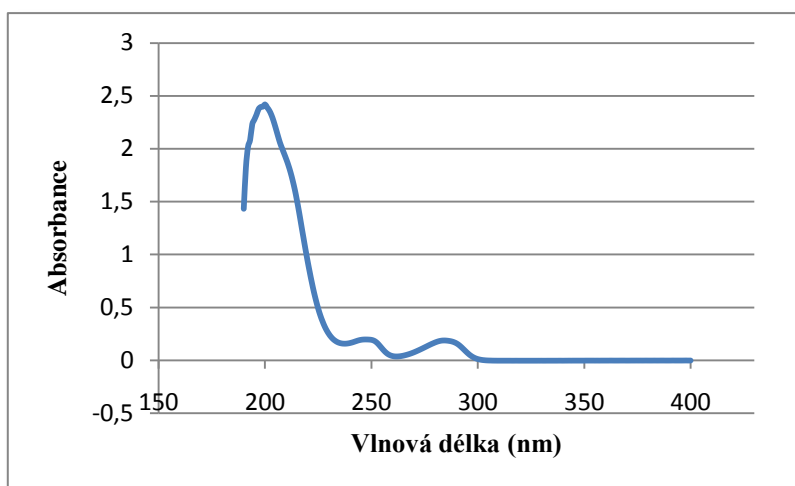
Obrázek 8: Absorpční spektrum ABZ v acetonitrilu



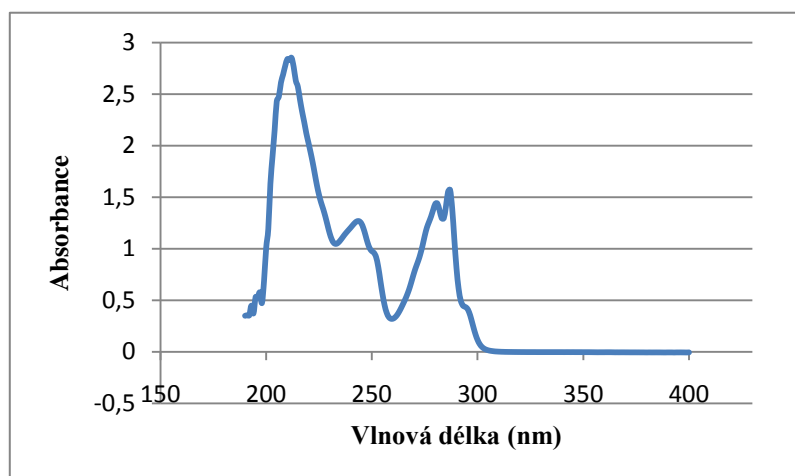
Obrázek 9: Absorpční spektrum 2-AB v methanolu



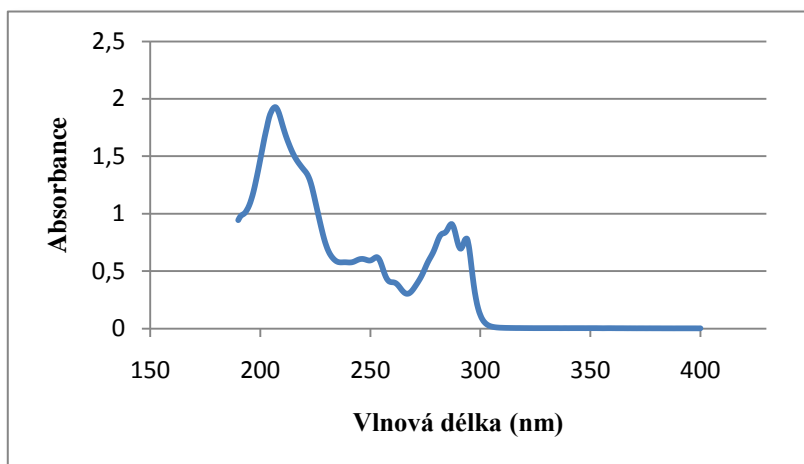
Obrázek 10: Absorpční spektrum 2-AB v acetonitrilu



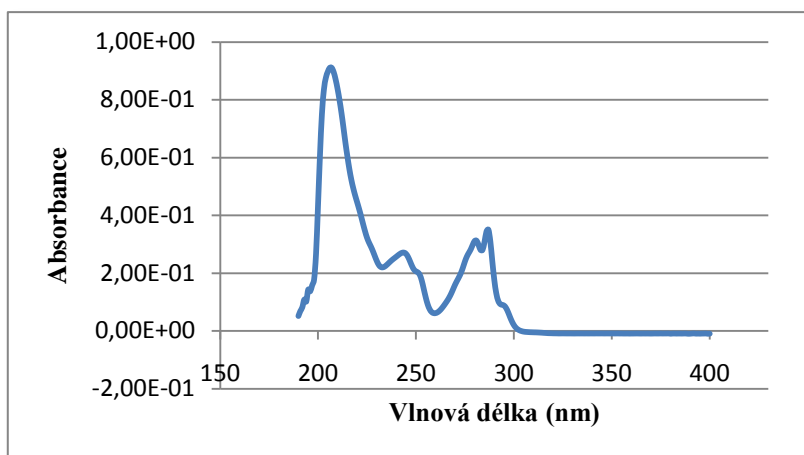
Obrázek 11: Absorpční spektrum BEN v methanolu



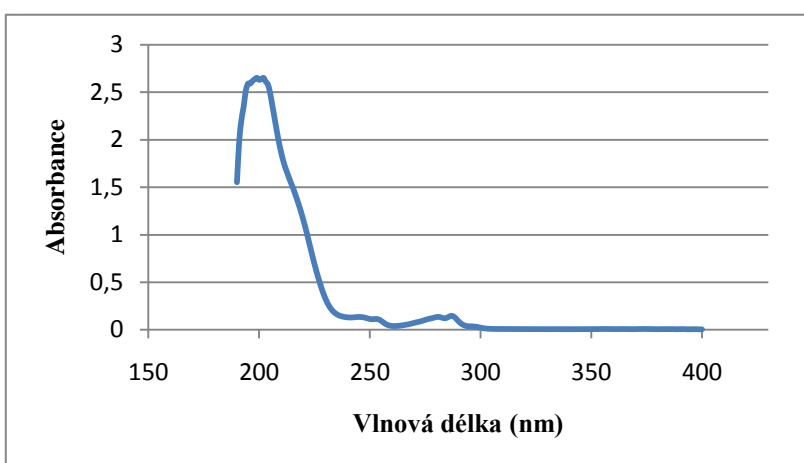
Obrázek 12: Absorpční spektrum BEN v acetonitrilu



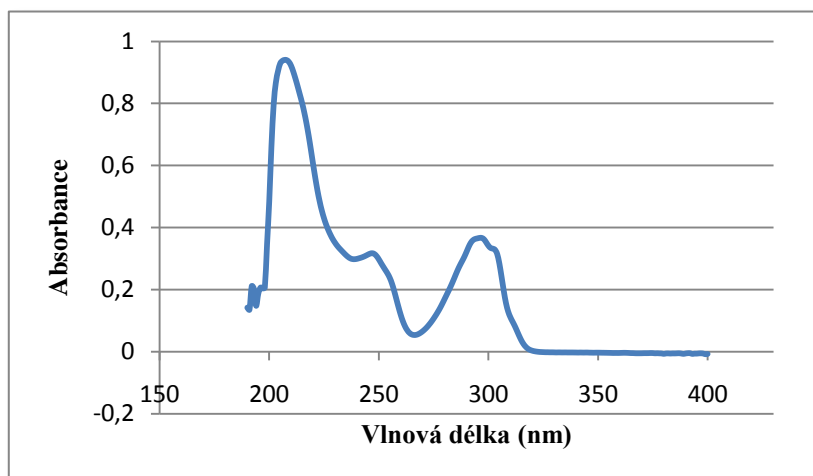
Obrázek 13: Absorpční spektrum MBC v methanolu



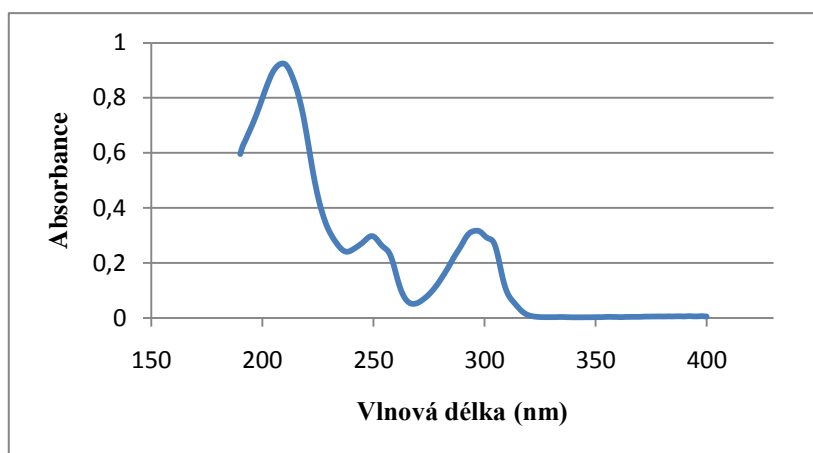
Obrázek 14: Absorpční spektrum MBC v acetonitrilu



Obrázek 15: Absorpční spektrum OXI v methanolu



Obrázek 16: Absorpční spektrum OXI v acetonitrilu



4.1.2 Fluorescenční spektra benzimidazolů v roztocích v methanolu a acetonitrilu

Následně jsem měřila u těchto roztoků fluorescenční spektra. Jako excitační vlnové délky byly použity vlnové délky příslušných absorpčních maxim.

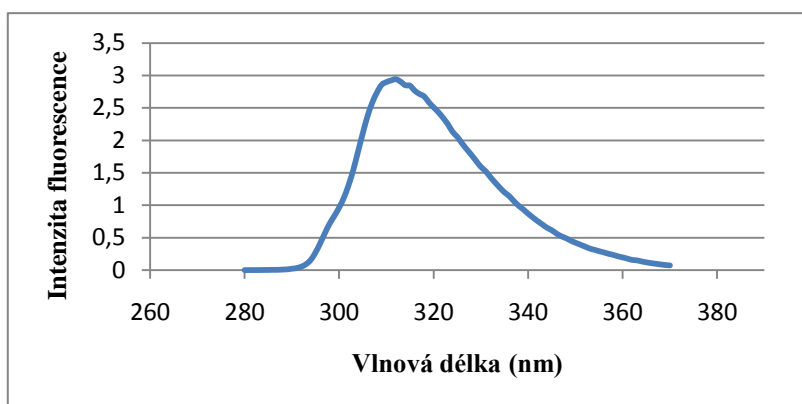
Hodnoty emisních maxim a intenzit fluorescence uvádí tabulka 2.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty emisních maxim a intenzit fluorescence jednotlivých roztoků

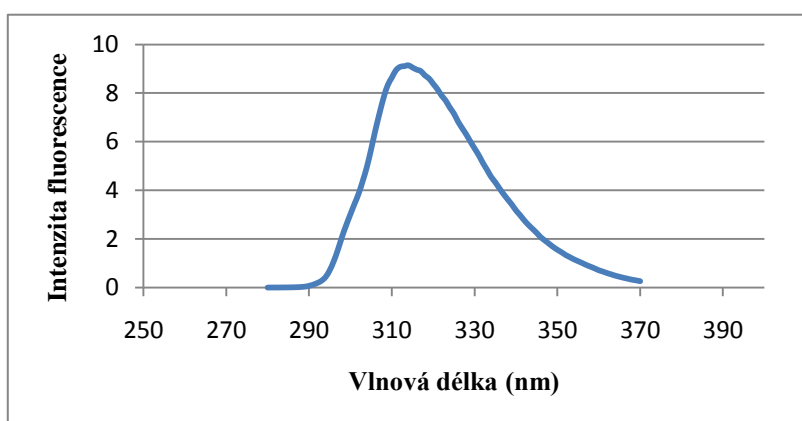
Methanolicke roztoky	Emisní vlnová délka λ_{em} [nm]	Intenzita fluorescence	Acetonitrilové roztoky	Emisní vlnová délka λ_{em} [nm]	Intenzita fluorescence
FLU	312	2,941	FLU	314	9,146
TBZ	340	8,341	TBZ	351	6,636
ABZ	339	4,617	ABZ	340	5,893
2-AB	295	5,995	2-AB	313	5,836
BEN	309	4,39	BEN	313	6,912
MBC	308	5,87	MBC	307	5,917
OXI	322	5,796	OXI	323	5,866

Naměřená fluorescenční spektra uvádějí obrázky 17-30:

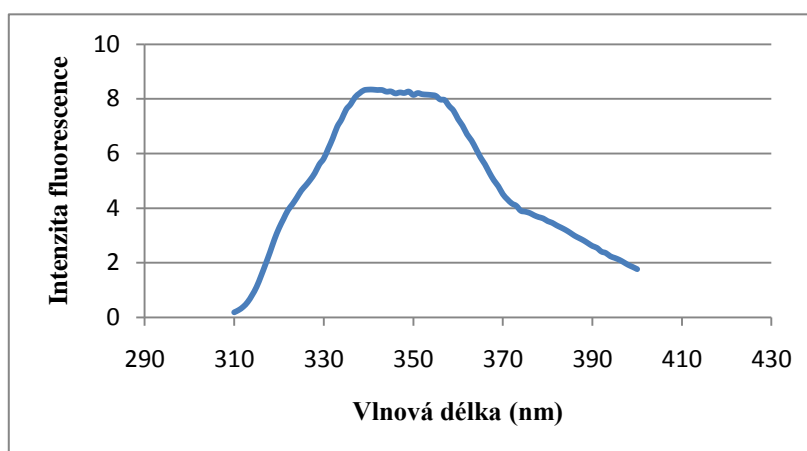
Obrázek 17: Fluorescenční spektrum FLU v methanolu



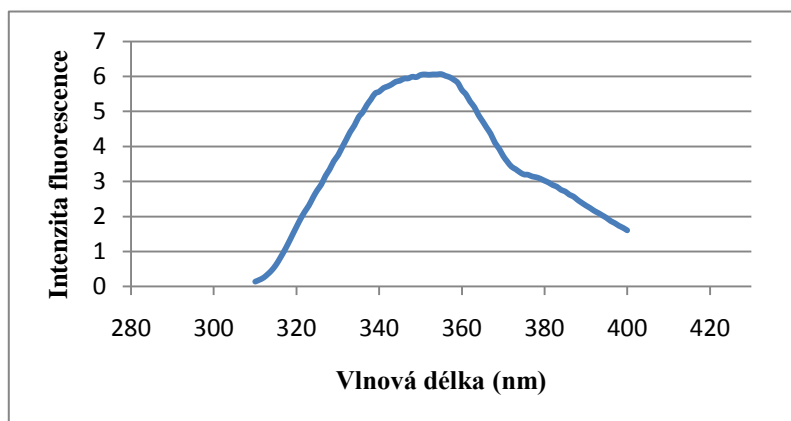
Obrázek 18: Fluorescenční spektrum FLU v acetonitrilu



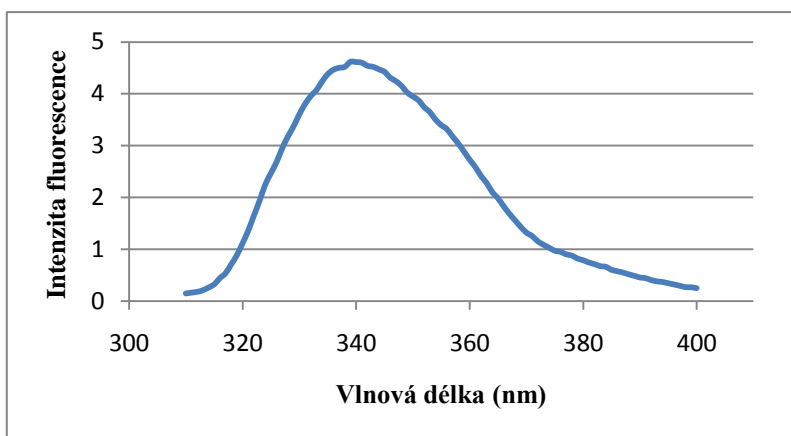
Obrázek 19: Fluorescenční spektrum TBZ v methanolu



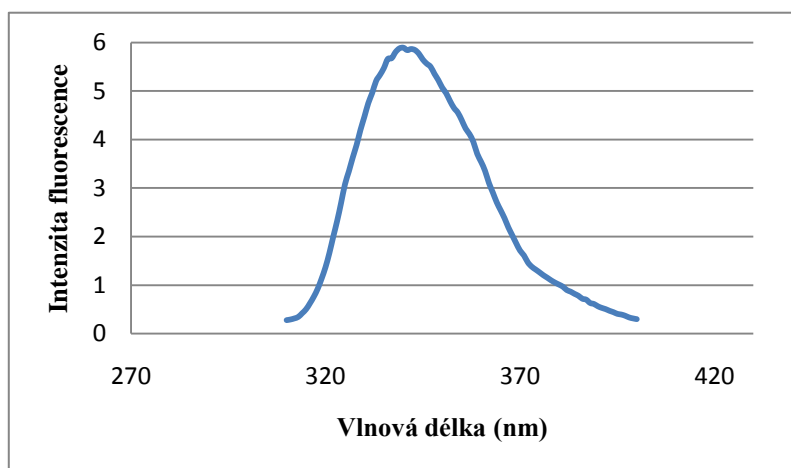
Obrázek 20: Fluorescenční spektrum TBZ v acetonitrilu



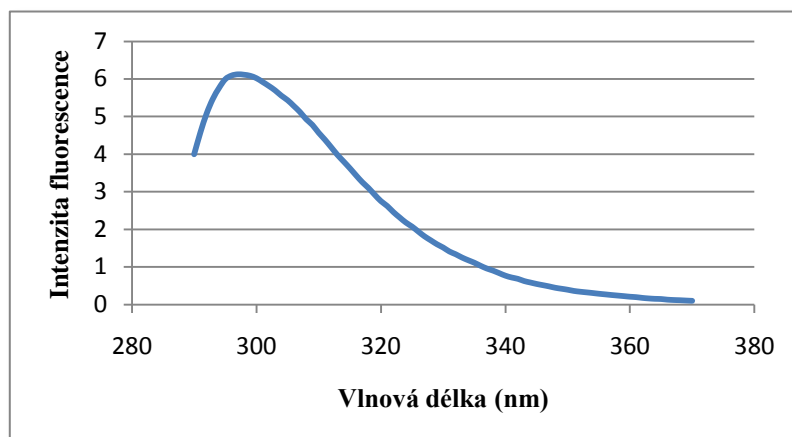
Obrázek 21: Fluorescenční spektrum ABZ v methanolu



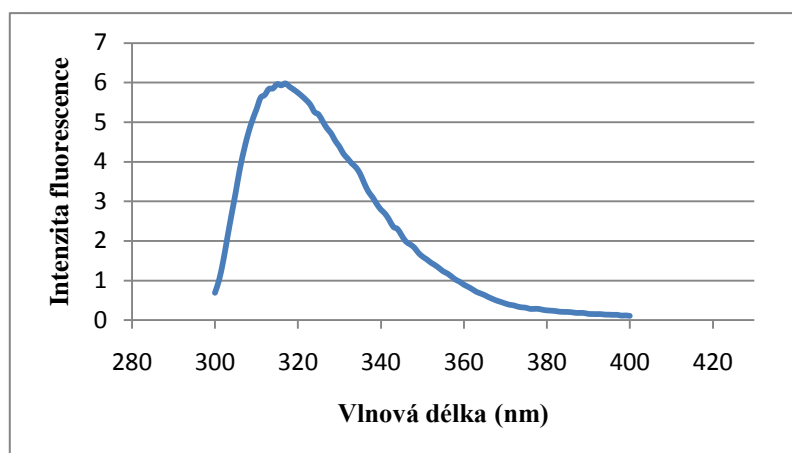
Obrázek 22: Fluorescenční spektrum ABZ v acetonitrilu



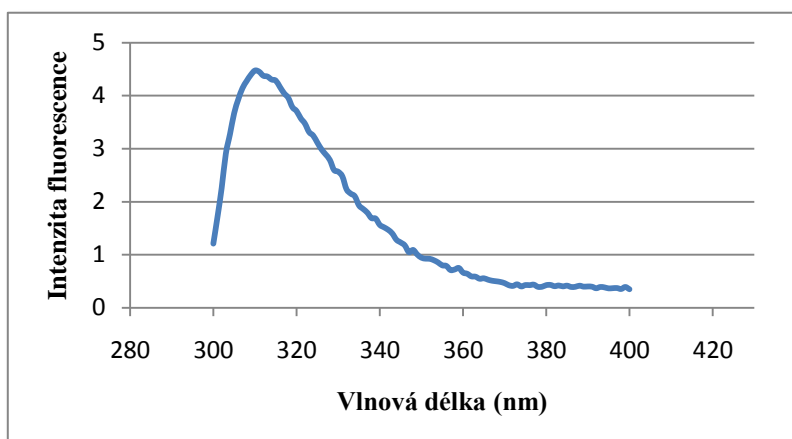
Obrázek 23: Fluorescenční spektrum 2-AB v methanolu



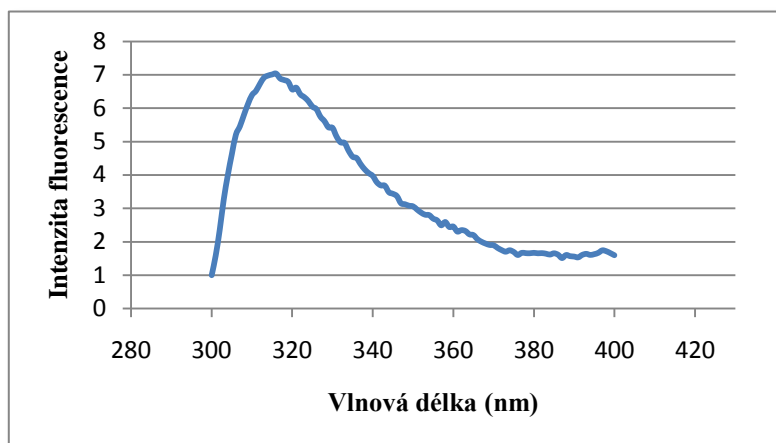
Obrázek 24: Fluorescenční spektrum 2-AB v acetonitrilu



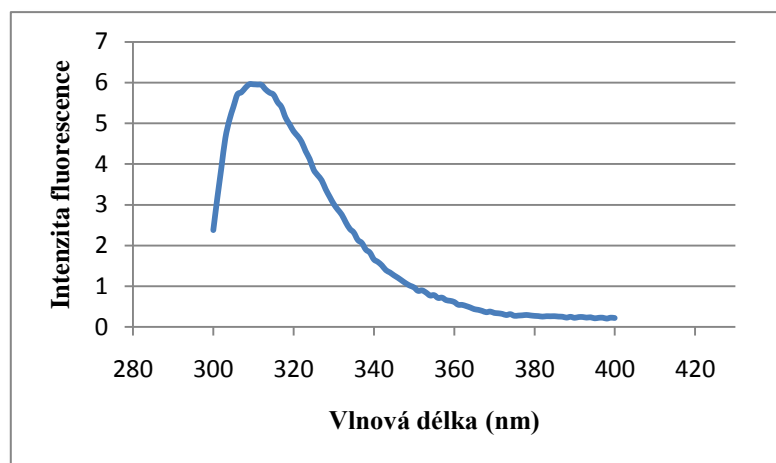
Obrázek 25: Fluorescenční spektrum BEN v methanolu



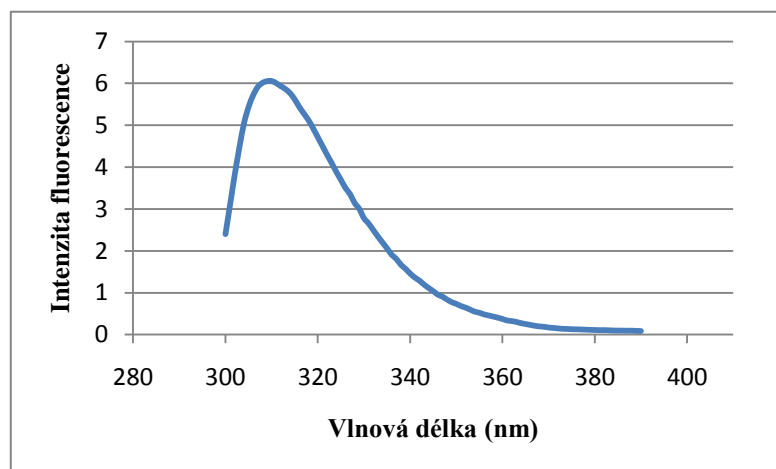
Obrázek 26: Fluorescenční spektrum BEN v acetonitrilu



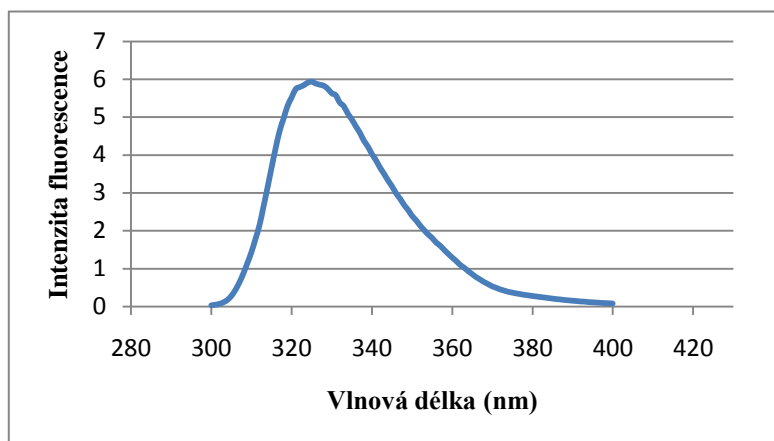
Obrázek 27: Fluorescenční spektrum MBC v methanolu



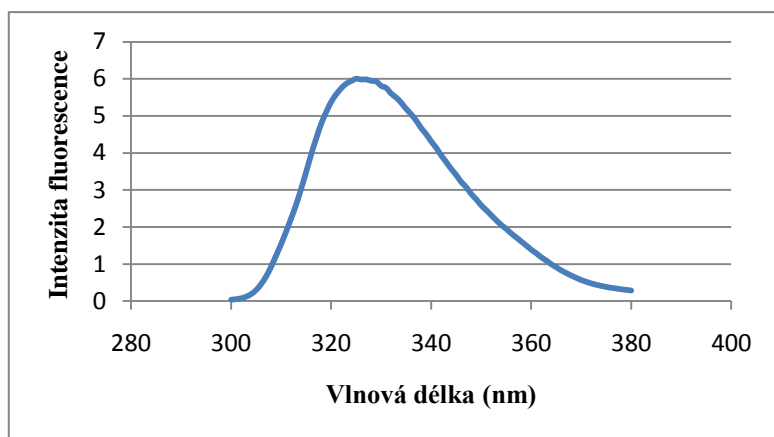
Obrázek 28: Fluorescenční spektrum MBC v acetonitrilu



Obrázek 29: Fluorescenční spektrum OXI v methanolu



Obrázek 30: Fluorescenční spektrum OXI v acetonitrilu



4.1.3 UV-VIS absorpční spektra v roztocích s přidavkem fosfátového pufru

Další měření proběhla se směsí 1,5 ml vybraného zředěného benzimidazolu a 3,5 ml fosfátového pufru o pH 3,0.

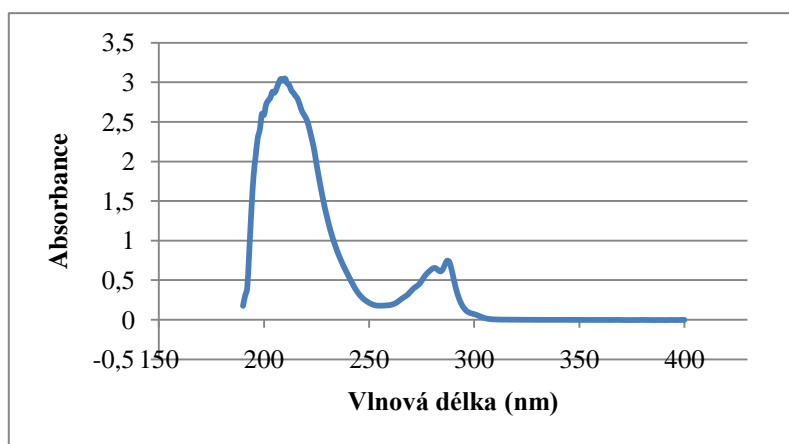
Hodnoty absorpčních maxim uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Absorpční maxima zjištěná u jednotlivých pufrovaných roztoků

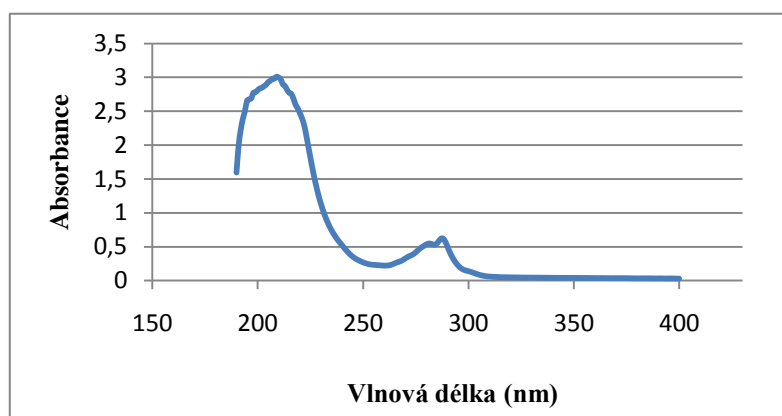
Methanolické roztoky	c[mmol/l]	Maximální vlnové délky λ_{\max} [nm]	Acetonitrilové roztoky	c[mmol/l]	Maximální vlnové délky λ_{\max} [nm]
FLU	0,1475	210, 287, 281	FLU	0,118	209, 288, 282
TBZ	0,02825	195, 208, 302	TBZ	0,02775	208, 302, 243
ABZ	0,02475	208, 197, 295	ABZ	0,02475	196, 207, 297
2-AB	0,106	201, 275, 280	2-AB	0,027	193, 202, 275, 280
BEN	0,1267	196, 223, 275, 282	BEN	0,062	193, 202, 275, 280
MBC	0,0371	197, 224, 275, 282	MBC	0,01778	191, 208, 275, 282
OXI	0,03128	196, 231, 292	OXI	0,03128	198, 231, 292

Naměřená absorpční spektra pufrovaných roztoků uvádějí obrázky 31-44:

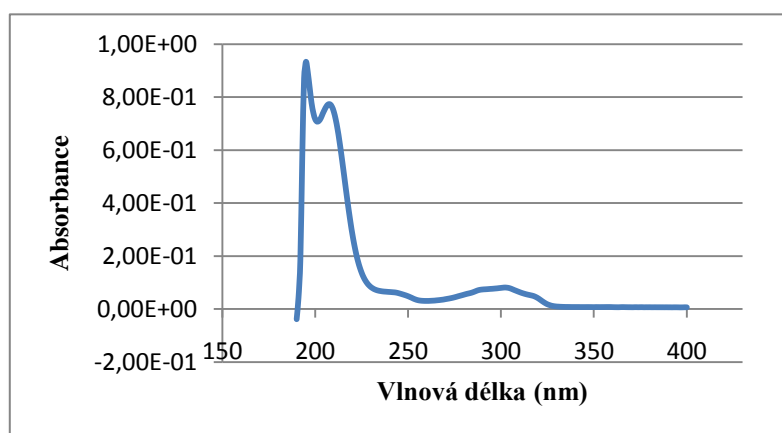
Obrázek 31: Absorpční spektrum pufrovaného FLU v methanolu



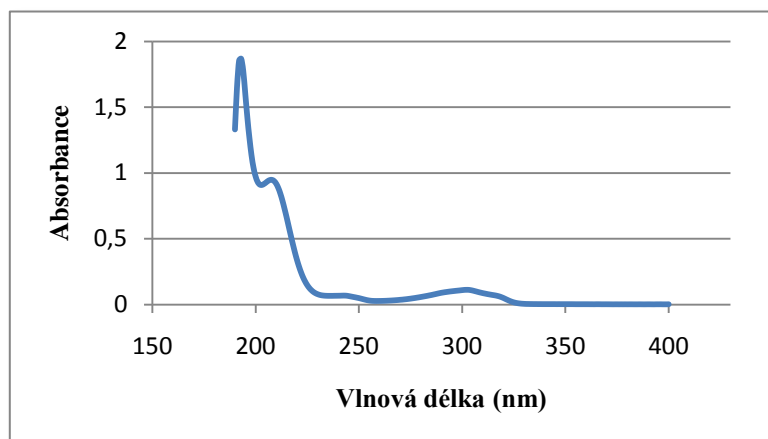
Obrázek 32: Absorpční spektrum pufrovaného FLU v acetonitrilu



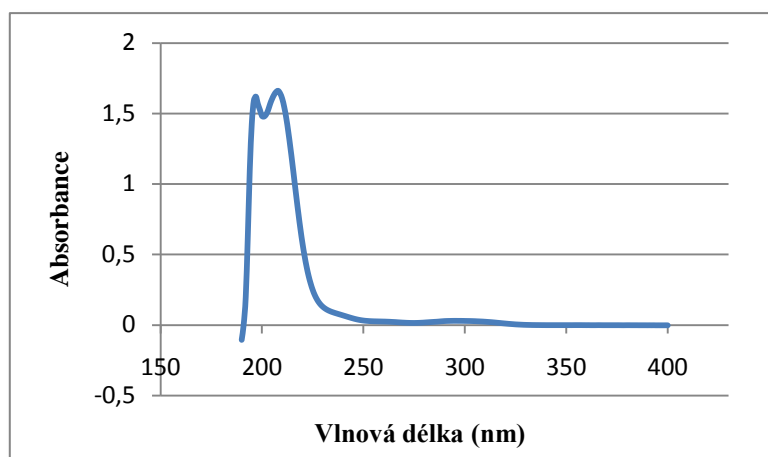
Obrázek 33: Absorpční spektrum pufrovaného TBZ v methanolu



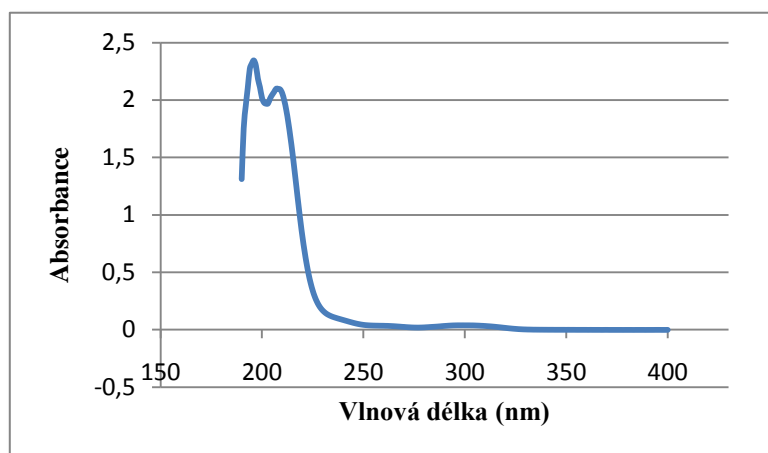
Obrázek 34: Absorpční spektrum pufovaného TBZ v acetonitrilu



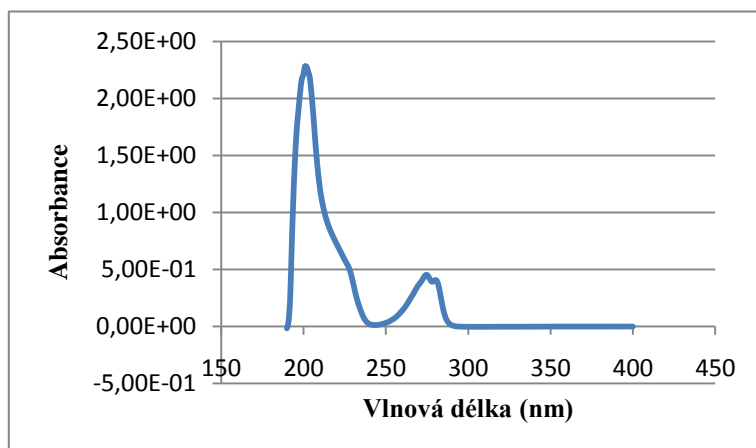
Obrázek 35: Absorpční spektrum pufovaného ABZ v methanolu



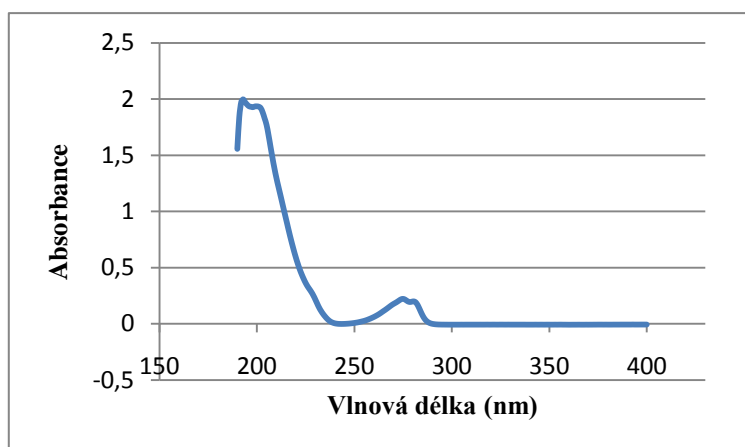
Obrázek 36: Absorpční spektrum pufovaného ABZ v acetonitrilu



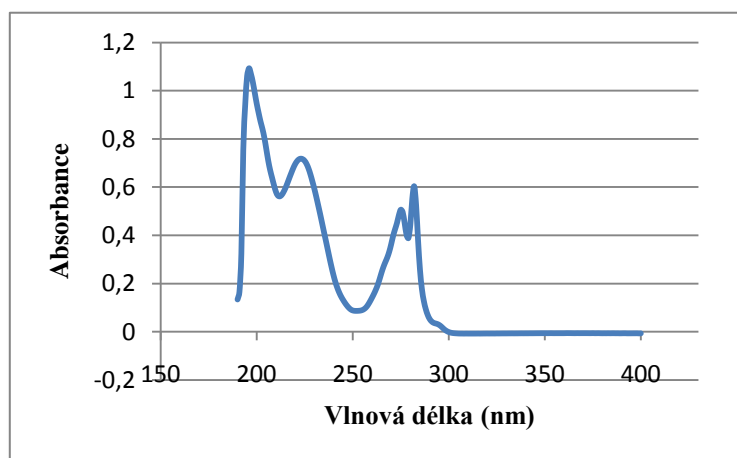
Obrázek 37: Absorpční spektrum pufovaného 2-AB v methanolu



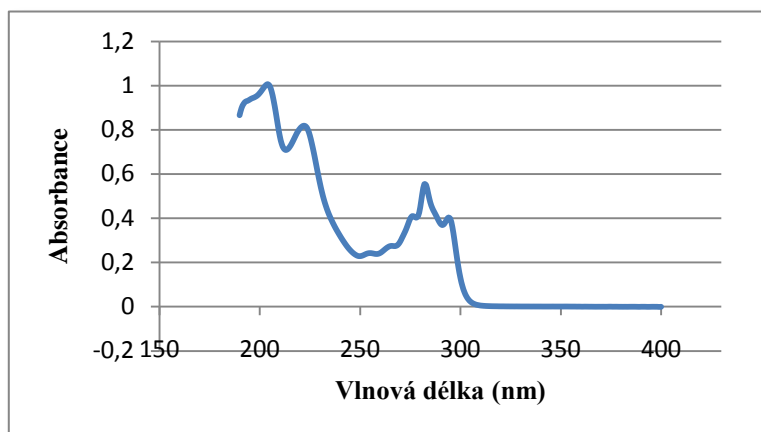
Obrázek 38: Absorpční spektrum pufovaného 2-AB v acetonitrilu



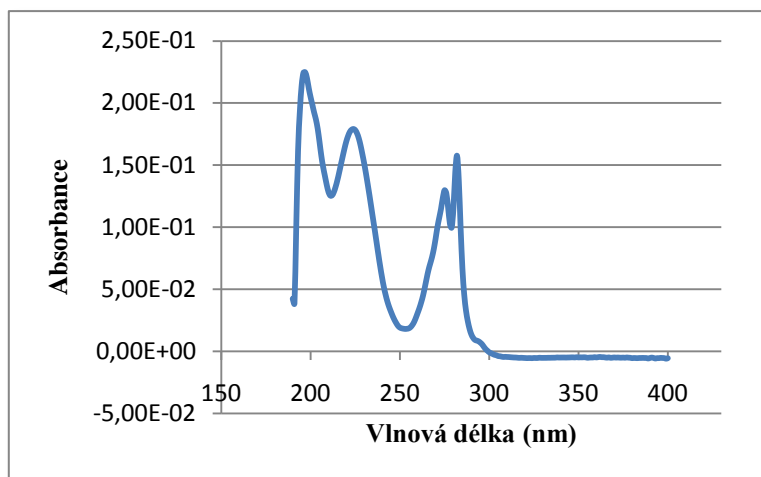
Obrázek 39: Absorpční spektrum pufovaného BEN v methanolu



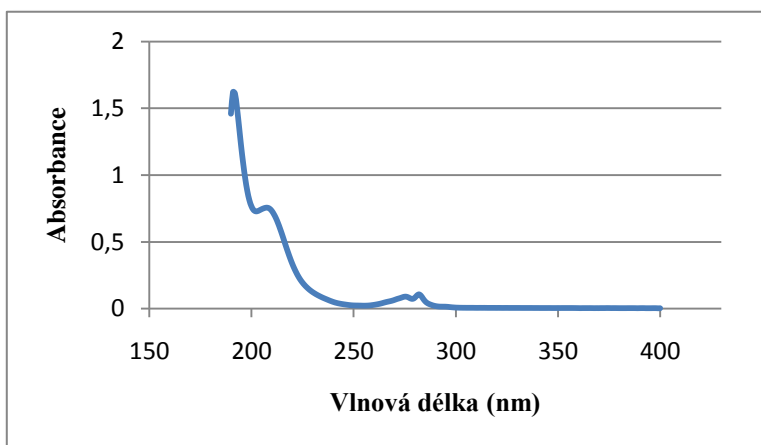
Obrázek 40: Absorpční spektrum pufovaného BEN v acetonitrilu



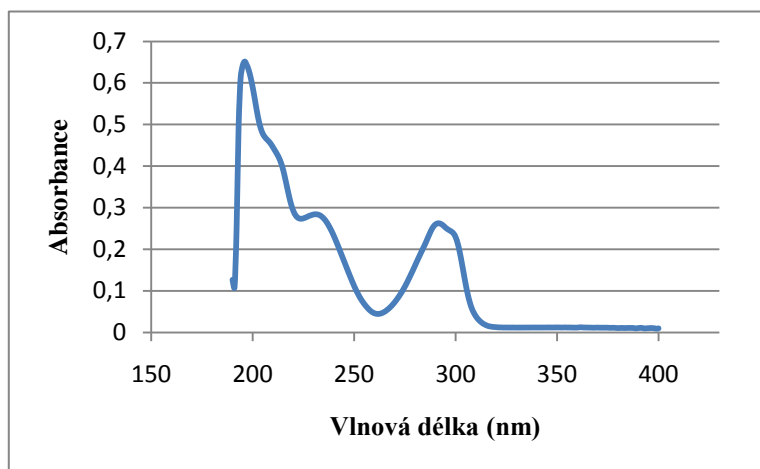
Obrázek 41: Absorpční spektrum pufovaného MBC v methanolu



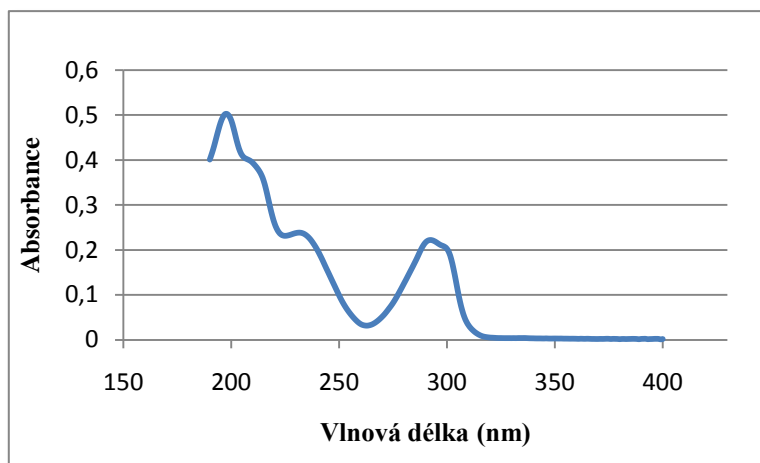
Obrázek 42: Absorpční spektrum pufovaného MBC v acetonitrilu



Obrázek 43: Absorpční spektrum pufovaného OXI v methanolu



Obrázek 44: Absorpční spektrum pufovaného OXI v acetonitrilu



4.1.4 Fluorescenční spektra v roztocích s přidavkem fosfátového pufru

U těchto pufrovaných roztoků jsem poté opět měřila fluorescenční spektra. Jako excitační vlnové délky byly použity vlnové délky příslušných absorpčních maxim.

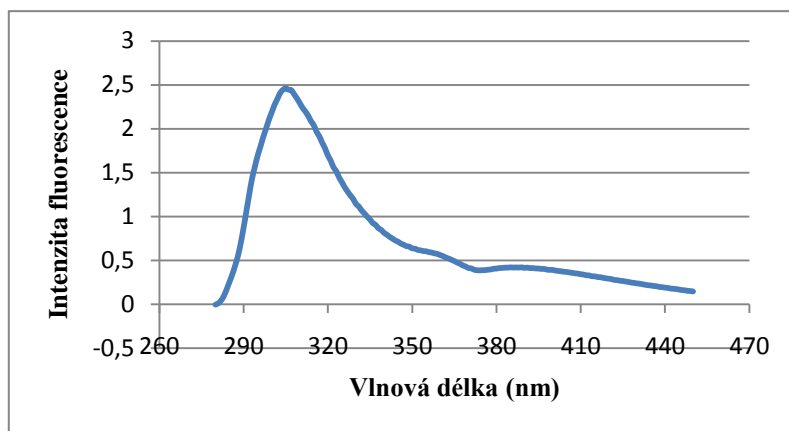
Hodnoty emisních maxim a intenzit fluorescence uvádí tabulka 4:

Tabulka 4: Naměřené hodnoty emisních maxim a intenzit fluorescence pufrovaných roztoků

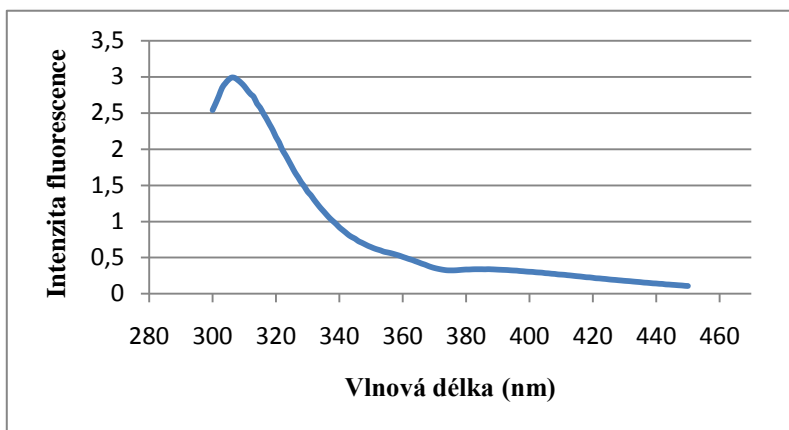
Methanolické roztoky	Emisní vlnová délka λ_{em} [nm]	Intenzita fluorescence	Acetonitrilové roztoky	Emisní vlnová délka λ_{em} [nm]	Intenzita fluorescence
FLU	310	9,933	FLU	310	9,998
TBZ	347	4,469	TBZ	347	6,128
ABZ	352	3,404	ABZ	350	6,107
2-AB	313	5,917	2-AB	295	7,538
BEN	302	5,936	BEN	308	4,859
MBC	300	6,081	MBC	301	6,067
OXI	401	5,614	OXI	398	5,662

Naměřená fluorescenční spektra pufrovaných roztoků uvádějí obrázky 45-58:

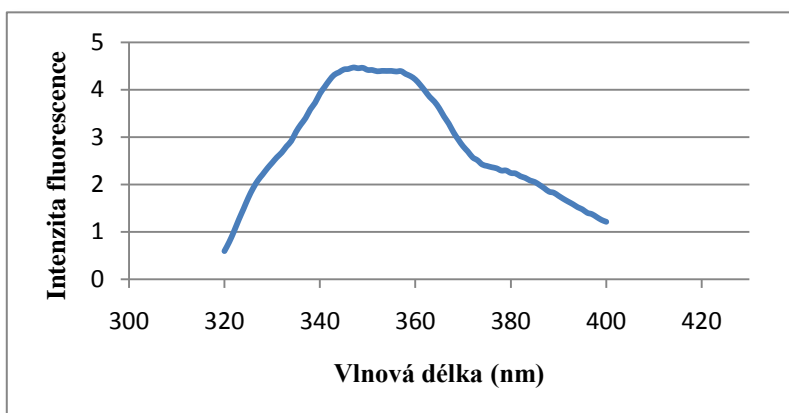
Obrázek 45: Fluorescenční spektrum pufrovaného FLU v methanolu



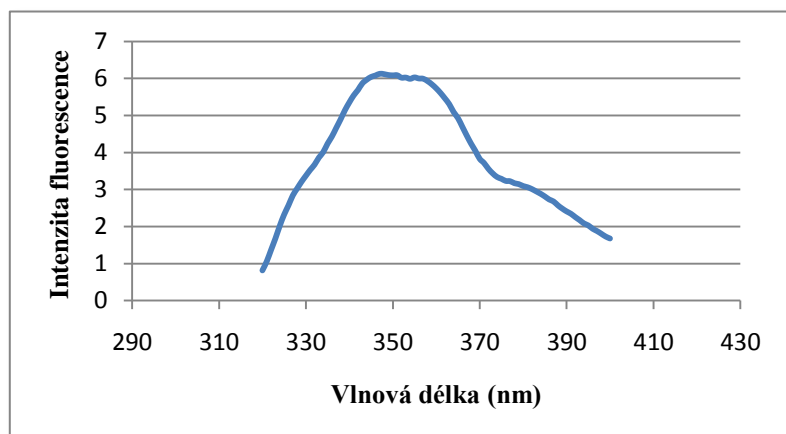
Obrázek 46: Fluorescenční spektrum pufrovaného FLU v acetonitrilu



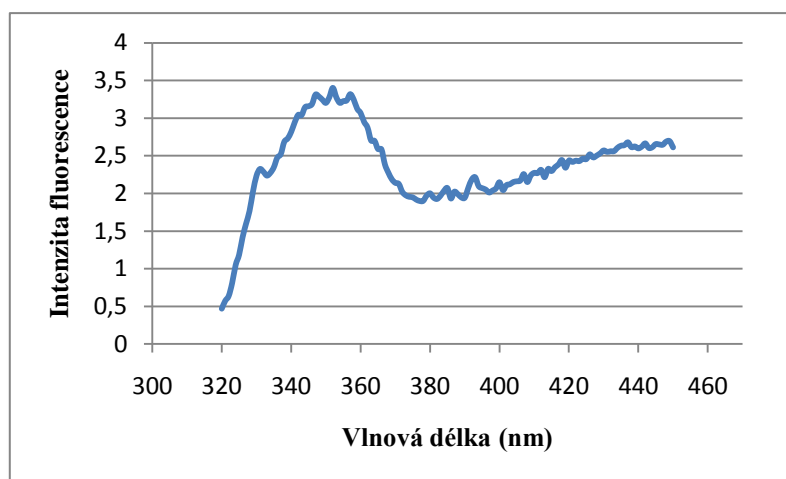
Obrázek 47: Fluorescenční spektrum pufrovaného TBZ v methanolu



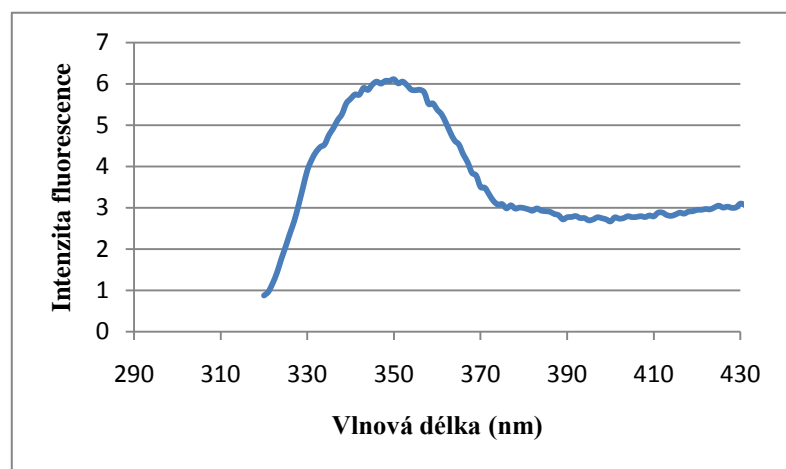
Obrázek 48: Fluorescenční spektrum pufovaného TBZ v acetonitrilu



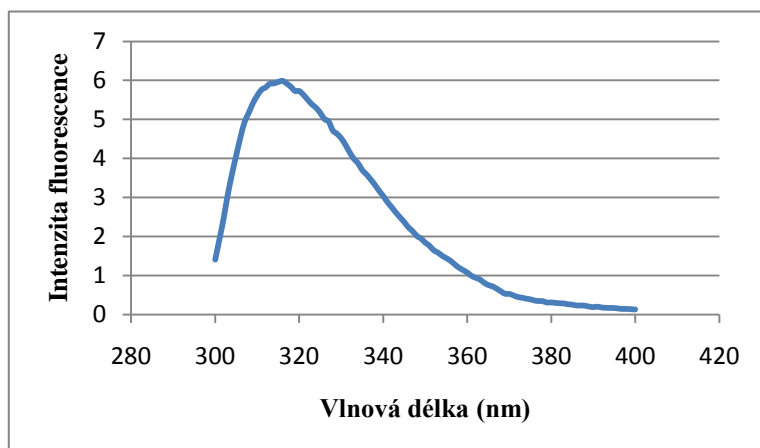
Obrázek 49: Fluorescenční spektrum pufovaného ABZ v methanolu



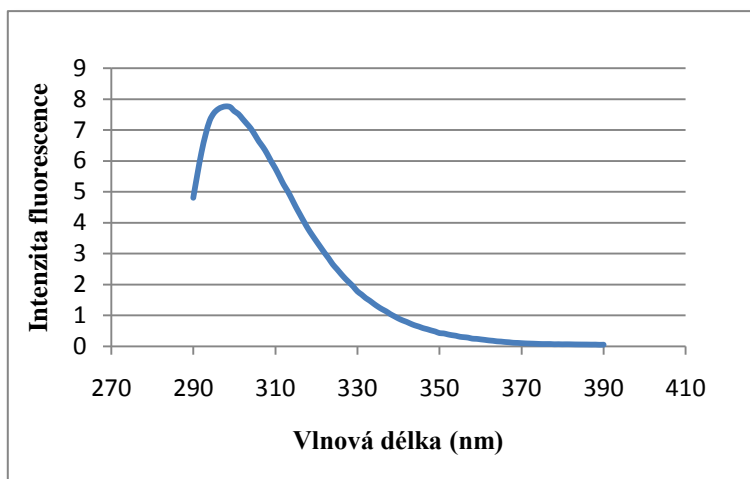
Obrázek 50: Fluorescenční spektrum pufovaného ABZ v acetonitrilu



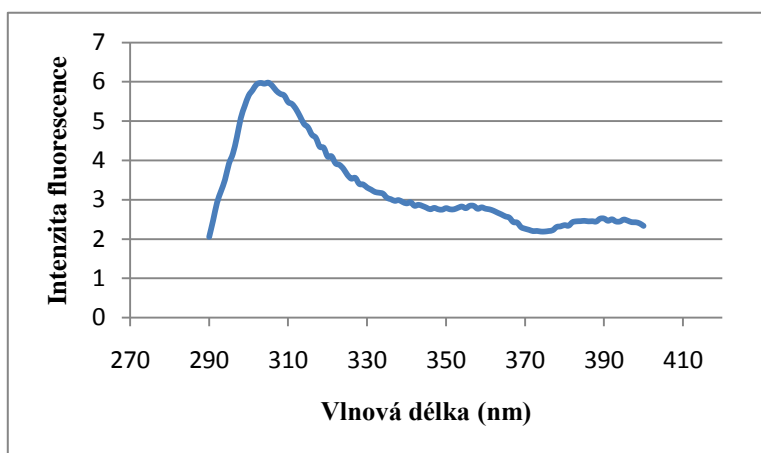
Obrázek 51: Fluorescenční spektrum pufovaného 2-AB v methanolu



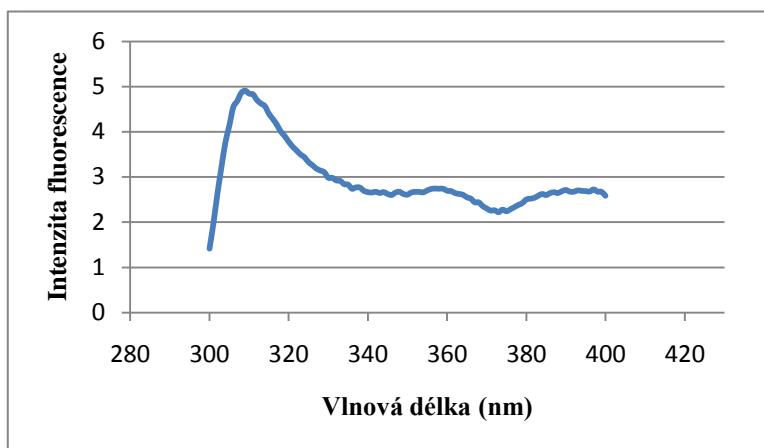
Obrázek 52: Fluorescenční spektrum pufovaného 2-AB v acetonitrilu



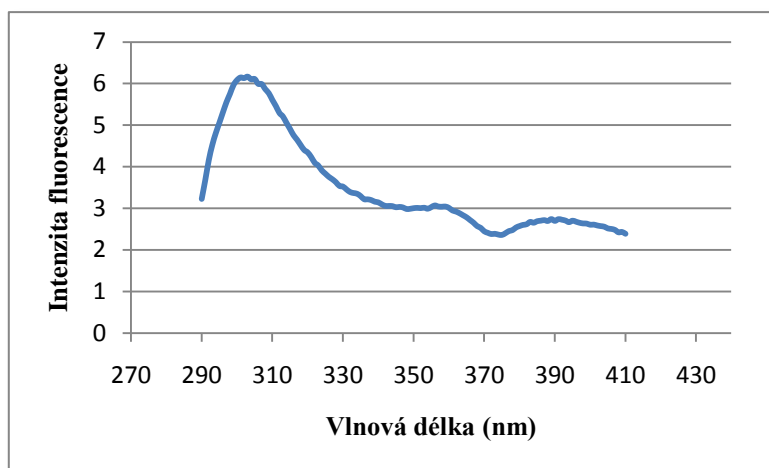
Obrázek 53: Fluorescenční spektrum pufovaného BEN v methanolu



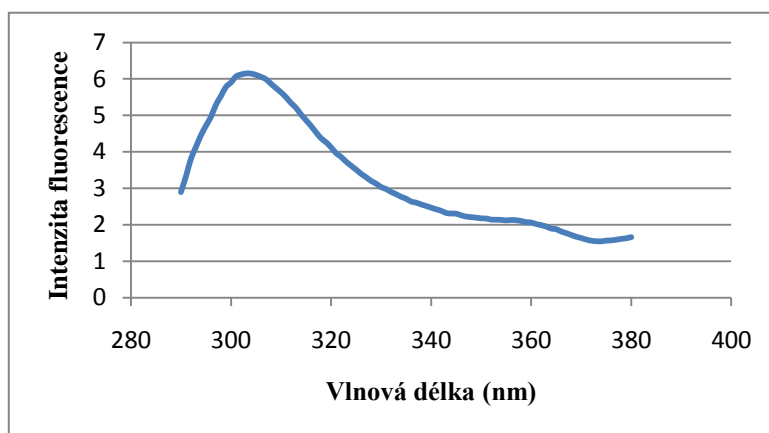
Obrázek 54: Fluorescenční spektrum pufovaného BEN v acetonitrilu



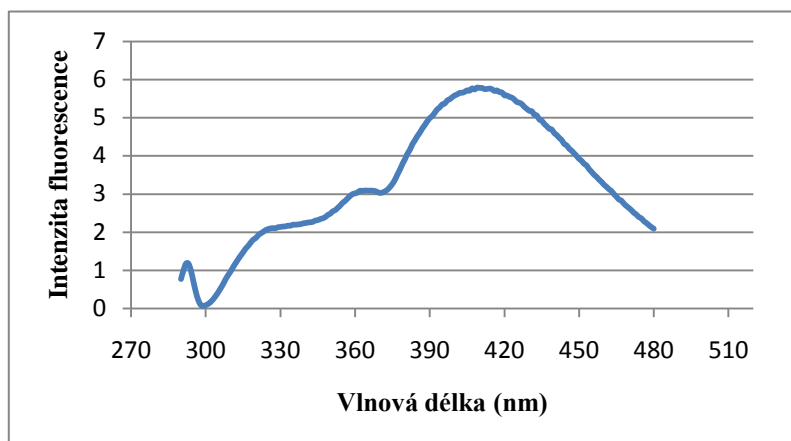
Obrázek 55: Fluorescenční spektrum pufovaného MBC v methanolu



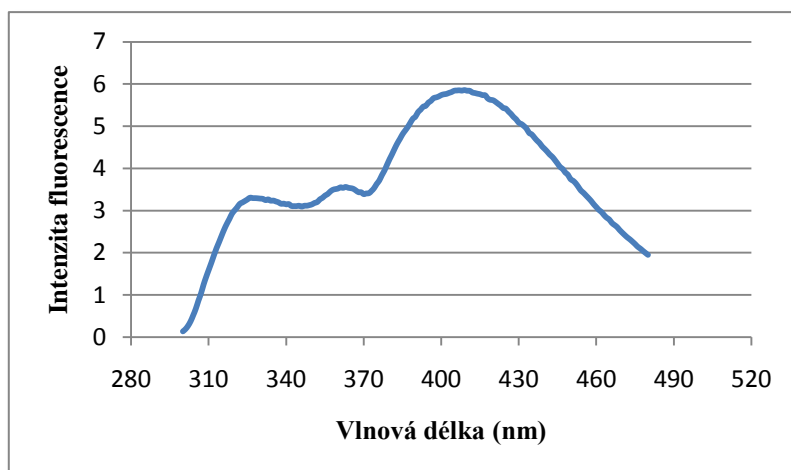
Obrázek 56: Fluorescenční spektrum pufovaného MBC v acetonitrilu



Obrázek 57: Fluorescenční spektrum pufovaného OXI v methanolu



Obrázek 58: Fluorescenční spektrum pufovaného OXI v acetonitrilu



4.2 Studium derivatizační reakce MBZ:

4.2.1 Stanovení optimálního pH

Měřila jsem při čtyřech různých hodnotách pH borátového pufru. Měření probíhala za následujících podmínek:

doba třepání v termostatické lázni byla 30 minut při teplotě 60 °C; pH = 9,0

$c_{\text{MBZ}} = 0,5926 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 5:

Tabulka 5: Závislost intenzity fluorescence na pH

Vzorek	pH	Intenzita fluorescence
1	8	2,464
Slepý vz. 1		1,560
2	9	6,213
Slepý vz. 2		4,390
3	10	2,766
Slepý vz. 3		1,270
4	11	4,818
Slepý vz. 4		3,275

4.2.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na době třepání reakční směsi v termostatu

Testovala jsem vliv doby třepání v termostatické lázni na intenzitu fluorescence. Měření probíhala za následujících podmínek:

teplota 60 °C; pH = 9,0

$c_{\text{MBZ}} = 0,5926 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 6:

Tabulka 6: Závislost intenzity fluorescence na době třepání

vzorek	Doba třepání [min]	Intenzita fluorescence
1	10	5,102
Slepý vz. 1		5,346
2	20	6,302
Slepý vz. 2		5,366
3	30	6,182
Slepý vz. 3		0,00183

4.2.3 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na teplotě v reakční směsi

Měřila jsem tři vzorky a k nim příslušné slepé vzorky. U každého vzorku jsem použila jinou teplotu v termostatické lázni. Měření probíhala za následujících podmínek:

doba třepání v termostatické lázni byla 30 minut při pH 9,0

$c_{\text{MBZ}} = 0,5926 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 7:

Tabulka 7: Závislost intenzity fluorescence na teplotě

Vzorek	Teplota [°C]	Intenzita fluorescence
1	50	5,148
Slepý vz. 1		4,832
2	60	6,213
Slepý vz. 2		4,39
3	70	2,671
Slepý vz. 3		1,4444

4.3 Stanovení stechiometrie derivatizační reakce:

4.3.1 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku MBZ při konstantní koncentraci činidla NBD-Cl

První pokus, jehož výsledky jsou shrnuty v tabulce 8, byl proveden s koncentracemi MBZ v rozsahu 0,1447 – 0,5791 mmol/l. Další podmínky reakce byly tyto:

teplota v termostatické lázni byla 60 °C, doba třepání 30 minut

MBZ daných koncentrací; $c_{\text{NBD-Cl}} = 3 \text{ g/l}$; pH = 9,0

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

Tabulka 8: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci MBZ

vzorek	cMBZ [mmol/l]	Intenzita fluorescence
1	0,5791	6,026
2	0,4343	7,014
3	0,2895	6,364
4	0,1447	7,132
5	slepý vzorek	5,527

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům tohoto pokusu byly nejprve sníženy koncentrace MBZ 10x. Protože ani pak nedošlo ke zlepšení, roztok činidla NBD-Cl byl 30x zředěn a doba třepání zkrácena na 10 minut. Podmínky stanovení byly tedy následující:

teplota v termostatické lázni byla 60 °C, doba třepání 10 minut; pH = 9,0

MBZ daných koncentrací; $c_{\text{NBD-Cl}} = 0,1 \text{ g/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

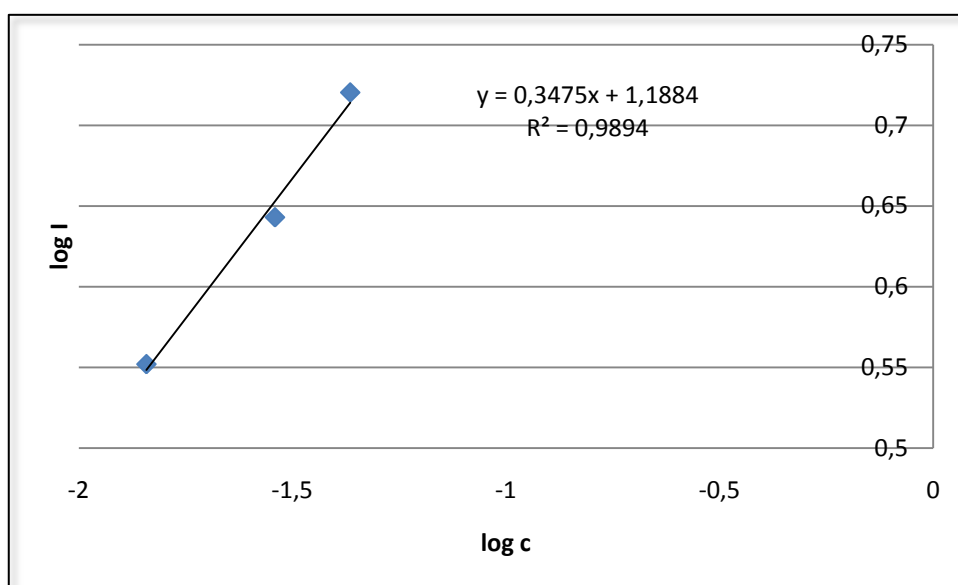
Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 9:

Tabulka 9: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci MBZ

vzorek	cMBZ [mmol/l]	Intenzita fluorescence
1	0,05753	3,513
2	0,04314	5,252
3	0,02876	4,395
4	0,01438	3,564

Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace MBZ uvádí graf 1.

Graf 1: Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace MBZ



Hodnota směrnice přímky je 0,3475.

4.3.2 Stanovení závislosti intenzity fluorescence na koncentraci činidla NBD-Cl při konstantní koncentraci MBZ

Měření probíhala se čtyřmi vzorky s různou koncentrací roztoku činidla NBD-Cl za následujících podmínek:

teplota v termostatické lázni byla 60 °C, doba třepání 10 minut; pH = 9,0

činidlo NBD-Cl daných koncentrací; $c_{\text{MBZ}} = 0,06329 \text{ mmol/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

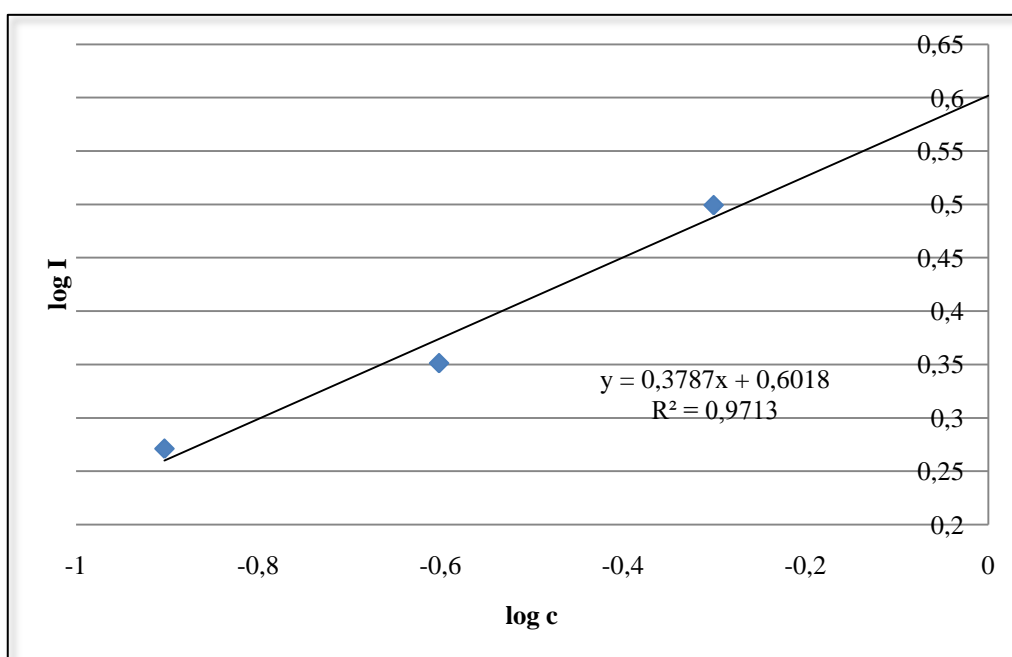
Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 10:

Tabulka 10: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci NBD-Cl

Vzorek	cNBD-Cl [g/l]	cNBD-Cl [mmol/l]	Intenzita fluorescence
1	0,2	1	6,636
2	0,1	0,5	3,156
3	0,05	0,25	2,245
4	0,025	0,125	1,867

Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NBD-Cl uvádí graf 2.

Graf 2: Závislost log intenzity fluorescence na log koncentrace NBD-Cl



Hodnota směrnice přímky je 0,3787.

4.4 Stanovení opakovatelnosti metody

Provedla jsem osm paralelních měření za následujících podmínek:

teplota v termostatické lázni byla 60 °C, doba třepání 10 minut; pH = 9,0

$c_{\text{MBZ}} = 0,014815 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{NBD-Cl}} = 0,1 \text{ g/l}$

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$

Naměřené hodnoty fluorescence uvádí tabulka 11:

Tabulka 11: Hodnoty intenzit fluorescence jednotlivých vzorků

vzorek	Intenzita fluorescence
1	2,14
2	2,03
3	1,95
4	2,27
5	1,958
6	1,87
7	2,201
8	1,827

Z těchto naměřených hodnot byla určena opakovatelnost stanovení fluorescence s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení fluorescence 2,028

Relativní směrodatná odchylka 2,8029

5 Diskuze

První část mé diplomové práce spočívala v měření absorpčních a emisních elektronických spekter sedmi vybraných benzimidazolů. Nejprve jsem měřila spektra absorpční. Již v případě těchto spekter je patrná výrazná závislost jejich tvaru na struktuře jednotlivých benzimidazolů. Nejde o jev příliš překvapivý, neboť již dříve poukázal Nobilis¹⁸⁾ na skutečnost, že absorpčních elektronických spekter flubendazolu a jeho dvou metabolitů (hydrolyzovaného flubendazolu a redukovaného flubendazolu) lze využít k ověření identity těchto látek při HPLC stanovení s využitím PDA detektoru (detektoru s diodovým polem). V této práci jsem měřila absorpční spektra, aby bylo možno najít absorpční maxima, která jsem posléze využila jako excitační vlnové délky při měření emisních spekter. Studované benzimidazoly vykazují v použitých rozpouštědlech většinou 3 až 4 výrazná absorpční maxima. Spektra jsem měřila ve čtyřech rozpouštědlech: v čistém acetonitrilu, v čistém methanolu a v jejich směsích s fosfátovým pufrům pH = 3 v poměru 3:7. Tento poměr organického rozpouštědla a fosfátového pufru je často používán při HPLC analýzách benzimidazolových anthelmintik na kolonách naplněných fází C18. Připravené roztoky jsem musela ředit tak, aby naměřené absorbance spadaly do fotometrického rozsahu použitého spektrofotometru. Vliv použité změny organického rozpouštědla na absorpční elektronická spektra studovaných benzimidazolů je nevýrazný. V oblasti vyšších vlnových délek se absorpční maxima zjištěná v acetonitrilu prakticky shodují s maximy zjištěnými v methanolu. Podobná je situace v případě směsi acetonitrilu (resp. methanolu) s fosfátovým pufrům. Výjimkou jsou v některých případech absorpční maxima v oblasti kolem 200 nm. Zde je však třeba mít na zřeteli dvě skutečnosti. Za prvé se při těchto vlnových délkách pohybujeme již v oblasti koncové absorpce použitých rozpouštědel, zejména u methanolu. To je sice výrazně eliminováno slepým vzorkem, nicméně tato eliminace se týká spíše hodnot naměřených absorbancí v kvantitativní analýze. Hodnota vlnové délky absorpčního maxima je však v takovém případě zatížena významnou chybou. Navíc spektrální rozlišení použitého spektrofotometru je rovněž pouze průměrné. Za druhé nemají nižší excitační vlnové délky velkého významu pro měření fluorescenčních spekter.

Fluorescenční spektra jsem u všech benzimidazolů změřila za použití všech absorpčních maxim v roli excitačních vlnových délek. Bylo ovšem zjištěno, že tvar

těchto spekter se při změně excitační vlnové délky nemění. Dochází pouze ke snížení hodnot intenzity fluorescence se snižující se excitační vlnovou délkou. Prokázala se tak platnost Kashova pravidla, které říká, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . Fluorescenční spektra uvedená na obrázcích ve výsledkové části jsou spektra naměřená při nejvyšší excitační vlnové délce. Aby bylo možné sledovat vliv rozpouštědel na intenzitu fluorescence, bylo nutné zajistit stejnou koncentraci příslušného benzimidazolu v obou roztocích (v roztoku s acetonitrilem a v roztoku s methanolem). Proto jsem pro měření fluorescenčních spekter použila výchozí roztoky benzimidazolů, které jsem připravovala tak, aby podmínka stejné koncentrace v obou rozpouštědlech byla splněna. Rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými benzimidazoly jdou na vrub jejich různé rozpustnosti. Z porovnání výsledků měření fluorescence v roztocích bez pufrů je vidět značná různorodost fluorescenčního chování studovaných benzimidazolů. MBC a OXI nevykazují prakticky žádné změny vlnových délek emisních maxim nebo intenzit fluorescence při změně rozpouštědla. BEN fluoreskuje poněkud intenzivněji v acetonitrilu než v methanolu bez významné změny vlnové délky emisního maxima, naopak 2-AB intenzitu fluorescence nemění, ale pozoruhodně dochází k posunu vlnové délky emisního maxima. FLU a ABZ fluoreskují lépe v acetonitrilu, přičemž v případě FLU je poměr intenzit fluorescence v acetonitrilu a v methanolu větší než 3. K významným změnám vlnové délky emisního maxima v těchto případech nedochází. Opačně se chová TBZ, který prokazatelně lépe fluoreskuje v methanolu za současného hypsochromního posunu o 11 nm. V případě roztoků, které obsahovaly fosfátový pufr, jsou rozdíly v chování jednotlivých benzimidazolů méně výrazné. To je patrně způsobeno poměrem v množství organického rozpouštědla a pufru, díky němuž vliv pufru převažuje. Žádný vliv na fluorescenci nebyl pozorován u MBC, OXI a FLU. 2-AB, TBZ a ABZ fluoreskují lépe, je-li v roztoku přítomen acetonitril, BEN fluoreskuje poněkud lépe ve směsi pufr+methanol. Pozoruhodná je však výrazná změna vlnové délky emisního maxima, která je inverzní v porovnání s výsledky měření v samotných organických rozpouštědlech. Tento jev se v rámci mé diplomové práce nepodařilo vysvětlit a zasloužil by si dalšího zkoumání.

Zajímavé je porovnání fluorescence FLU a TBZ v samotných organických rozpouštědlech. FLU má vyšší intenzitu fluorescence v aprotickém acetonitrilu, zatímco TBZ v protogenním methanolu. To znamená, že FLU se chová spíše jako aromatický uhlovodík, ale TBZ jako azaren. Přitom se obě látky liší substituentem na fluoroforu. FLU obsahuje fluorbenzen vázaný na benzenový kruh fluoroforu, TBZ má thiazolový kruh vázaný na imidazolový kruh. Nelze očekávat, že by zmíněné substituenty měly přímý vliv na fluorescenci, tj. že by samy výrazně fluoreskovaly. Avšak vzhledem k popsanému chování zřejmě dochází k interakcím mezi dvěma benzenovými kruhy (v případě FLU) nebo mezi dvěma heterocykly (v případě TBZ), což zesiluje v jednom případě vliv aromatického charakteru fluoroforu na fluorescenci, v druhém případě vliv heterocyklického (azarenového) charakteru na fluorescenci.

Celkově lze ovšem konstatovat, že vliv rozpouštědel s různou polaritou a různou mírou protogenního charakteru je malý. To znamená, že obecně se benzimidazoly chovají jako azareny, protože přechod od acetonitrilu k methanolu, tedy od aprotického rozpouštědla k protogennímu nemá na intenzitu fluorescence významný destrukční vliv. To je významná skutečnost právě nyní, v době tzv. acetonitrilové krize, kdy je celosvětově nedostatek acetonitrilu, a lze očekávat snahy o jeho nahrazení právě methanolem.

Studium derivatizace MBZ pomocí NBD-Cl proběhlo postupem, který již byl na katedře biofyziky a fyzikální chemie aplikován ¹⁶⁾. Nejprve jsem stanovila optimální podmínky derivatizace a následně jsem stanovila stechiometrii derivatizační reakce a opakovatelnost. Při stanovení stechiometrie reakce jsem musela podmínky dále optimalizovat, neboť při příliš vysoké koncentraci MBZ i NBD-Cl a příliš dlouhé reakční době nebyly výsledky použitelné patrně z důvodu vysokého stupně hydrolýzy NBD-Cl. Po optimalizaci podmínek již bylo možné stechiometrii reakce stanovit, nicméně po jedné hodnotě v tabulkách 9 a 10 bylo nutno vyloučit. Patrně se zde již projevil vliv vnitřního filtru v analyzovaném roztoku, který zkreslil výslednou hodnotu intenzity fluorescence. Navíc jsou naměřené hodnoty fluorescence poměrně dost nízké, citlivost fluorimetru musela být nastavena pomocí roztoku pyrenu. Z poměru hodnot směrnic v grafech 1 a 2 vychází poměr stechiometrických koeficientů MBZ a NBD-Cl při derivatizační reakci 1:1, opakovatelnost stanovení je dobrá. Derivatizaci MBZ jsem prováděla s vědomím, že použitý postup byl vyvinut pro derivatizaci alifatických aminů, které jsou mnohem silnějšími nukleofily než

aminy aromatické. V této práci jsem učinila pokus zjistit, zda reakce mezi MBZ a NBD-Cl nemůže proběhnout do určité malé míry, dostatečné pro fluorescenční detekci MBZ metodou HPLC. Konečnou odpověď na tuto otázku může dát jedině HPLC experiment, který se z kapacitních důvodů nepodařilo v rámci této diplomové práce uskutečnit. Avšak předběžné pokusy v práci provedené nedávají této derivatizaci velké šance na úspěch.

6 Závěr

1. Chování studovaných benzimidazolů, které všechny vykazují nativní fluorescenci, lze při fluorescenci považovat za bližší chování azarenů než aromatických uhlovodíků.
2. Tyto vlastnosti se nejlépe projevily u TBZ, u něhož byla naměřena vyšší intenzita fluorescence v methanolickém roztoku než v roztoku acetonitrilovém při stejné koncentraci.
3. Výsledky získané při měření fluorescenčních spekter studovaných benzimidazolů jsou nadějně z pohledu případné náhrady acetonitrilu methanolem v mobilních fázích při HPLC.
4. Derivatizace MBZ činidlem NBD-Cl se z pohledu výsledků této diplomové práce jeví jako nevhodná.

Použitá literatura a zdroje:

1. Karlíček R. a kolektiv: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998, str. 225- 236.
2. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002, str. 12.
3. Waisser K., Pour M.: Organická chemie II., Karolinum, Praha 2003, str. 22- 27.
4. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004, str. 70.
5. Internetové stránky Univerzity Karlovy v Praze Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, studijní materiály katedry analytické chemie, Zdravotnická bioanalýtika, Speciální instrumentální metody, Teorie úloh a návody k přístrojům, Fluorimetrie
6. Štern P.: Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii, optické metody (1.5 fluorimetrie), dostupné z <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
7. Fišar Z.: Principy fluorescenční spektroskopie, Psychiatrická klinika, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
8. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie, 1.vyd. Vysoká škola chemicko- technologická v Praze, Praha 2006, str. 52- 54.
9. Internetové stránky Univerzity Karlovy v Praze Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, studijní materiály katedry farmakologie a toxikologie, Veterinární léčiva, Přednáška- anthelmintika
10. Danaher M., De Ruyck H., Crooks S.R., Dowling G., O'Keeffe M.: J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 845 (2007), 1- 37.
11. Kubíček V., Soukupová M., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Skálová L.: Chromatographia, 68 (2008), 865- 867.
12. Ghosh P.B., Whitehouse M.W.: Biochem.J. 108 (1968), 155- 156.
13. El- Emam Ali A., Hansen S. H., Moustafa M. A., El- Ashry S. M., El- Sherbiny D. T.: J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004), 35- 44.
14. Hrabálek A. a kolektiv: Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2002, str. 3, 18, 19.

15. Panchartek J., Štěrbá V., Večeřa M.: Reakční mechanismy v organické chemii, SNTL- Nakladatelství technické literatury, Praha 1981, str. 194, 198, 199.
16. Svárovská H.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2008.
17. Valeur B.: Molecular Fluorescence, Wiley-VCH, Weinheim 2001, str. 59.
18. Nobilis M., Jira T., Lída M., Holčápek M., Szotáková B., Lamka J., Skálová L.: J. Chromatogr. A 11449 (2007), 112- 120.